

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Dpto. Biología Molecular

**NANOTECNOLOGÍA
Y
VIH**

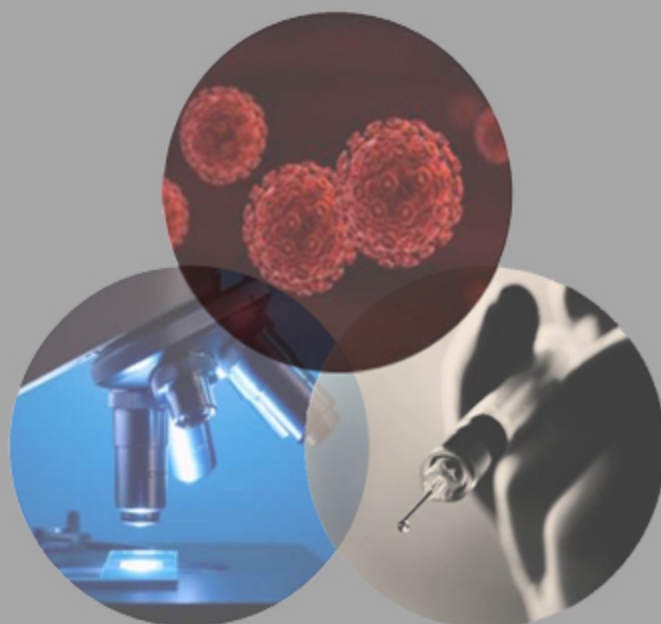
APLICACIÓN DE DENDRÍMEROS EN ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS Y PREVENTIVAS FRENTE A LA INFECCIÓN

Enrique Vacas Córdoba

Laboratorio Inmunobiología Molecular HGU Gregorio Marañón

Madrid 2013

Tesis Doctoral



Directores: M^a Ángeles Muñoz Fernández | Marjorie Pion



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**NANOTECNOLOGÍA y VIH: APLICACIÓN DE
DENDRÍMEROS EN ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS Y
PREVENTIVAS FRENTE A LA INFECCIÓN**

TESIS DOCTORAL

Enrique Vacas Córdoba

Madrid, 2013

Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Directores de Tesis:

Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Dra. Marjorie Pion

Esta Memoria ha sido realizada en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, bajo la dirección de la Doctora María Ángeles Muñoz Fernández y la Doctora Marjorie Pion. El trabajo experimental que se recoge en esta Memoria ha sido financiado por los proyectos europeos MNT ERA-Net transnational call 2007 (NAN2007-31198-E), FP7 Cooperation Work Programme: Health-2010 (DENPEPTHIV-EuroNanoMed), RED RIS RD06/0006/0035 y COST action TD0802



Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

Comunidad de Madrid



La Doctora María Ángeles Muñoz Fernández, Jefe de Sección del Servicio de Inmunología, Jefe del Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular y Directora del BioBanco VIH del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y la Doctora Marjorie Pion, Investigador Senior del Programa Ramón y Cajal en el Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación y la redacción de la Tesis Doctoral titulada: “Nanotecnología y VIH: Aplicación de dendrímeros en estrategias terapéuticas y preventivas frente a la infección” ha sido realizada por Enrique Vacas Córdoba, bajo nuestra dirección. Revisado el trabajo, consideramos éste como satisfactorio y autorizamos su presentación y defensa para optar al grado de Doctor con Mención Internacional en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que quede constancia de ello, firmamos el presente documento.

Madrid, 15 de Octubre de 2013

Fdo. Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández

Fdo. Dra. Marjorie Pion

A mis padres

ÍNDICE

SUMMARY.....	11
RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN.....	18
VIH Y SIDA: ASPECTOS GENERALES DE LA EPIDEMIA	18
LUCHA CONTRA EL VIH: NUEVAS ESTRATEGIAS	21
Vacunas frente al VIH	22
Microbicidas.....	27
NANOTECNOLOGÍA Y SU APLICACIÓN FRENTE AL VIH	33
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
DENDRÍMEROS	46
i) Glicodendrimeros	46
ii) Fosforodendrimeros	46
iii) Dendrimeros carbosilanos.....	47
CULTIVOS CELULARES	48
i) Células primarias.....	48
ii) Líneas celulares	49
AISLADOS VIRALES.....	50
REACTIVOS Y ANTIRRETROVIRALES.....	51
PREPARACIÓN DE COMPLEJOS DENDRÍMEROS-PÉPTIDO.....	52
ENSAYOS DE TOXICIDAD CELULAR	53
i. Ensayo MTT	53
ii. Ensayo MTS.....	53
INTERNALIZACIÓN Y FAGOCITOSIS DE LOS COMPLEJOS DENDRÍMERO-PÉPTIDO POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	54
ESTUDIO DEL FENOTIPO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	54
ENSAYOS DE MIGRACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	54
ESTIMULACIÓN ALOGÉNICA DE LINFOCITOS T POR PARTE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	55
ESTIMULACIÓN AUTÓLOGA DE LINFOCITOS T ESPECÍFICOS FRENTE AL VIH POR PARTE DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS CON LOS DENDRIPLEXES.....	55
EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN DEL VIH	56
i). Inhibición de la internalización en células epiteliales	56
ii). Inhibición de la adhesión (binding) e internalización del VIH en CMSP	57
iii). Inhibición de la replicación del VIH	57
iv). Inactivación del VIH por los dendrímeros de tipo carbosilano	57
v). Ensayos de “tiempo de adición”	58
vi). Ensayo de fusión celular.....	58
vii). Ensayo de ELISA gp120 VIH/CD4	58
viii). Inhibición de la transmisión de partículas virales libres y de células infectadas a través de una monocapa de células epiteliales.....	58
DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS DENDRÍMEROS Y LOS RECEPTORES Y CORRECEPTORES DE SUPERFICIE EN LAS CÉLULAS DIANA DE LA INFECCIÓN POR EL VIH	59
TRANSMISIÓN CÉLULA-CÉLULA DEL VIH	59
ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DENDRÍMEROS SOBRE LA SINAPSIS INFECCIOSA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.....	60
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	60
PERFIL DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS TH1/TH2	61
ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DENDRÍMEROS EN VAGINAS DE RATONES CD1 (ICR)	61
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS DENDRÍMEROS	61

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE LOS DENDRÍMEROS SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA.....	62
EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN DEL VHS-2.....	62
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
4. RESULTADOS.....	66
A. GLICODENDRÍMEROS Y DENDRÍMEROS DERIVADOS DEL FÓSFORO COMO VECTORES NO VIRALES EN INMUNOTERAPIAS FRENTE AL VIH BASADAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS	68
A. CARACTERIZACIÓN DEL USO DE GLICODENDRÍMEROS COMO VECTORES EN CÉLULAS DENDRÍTICAS	68
Los glicodendrimeros no son tóxicos para células dendríticas inmaduras y maduras.....	68
Los glicodendrimeros forman complejos con péptidos derivados del VIH.....	69
Los glicodendrimeros incrementan la captura de péptidos de las células dendríticas inmaduras y maduras.....	71
Los glicodendrimeros modifican levemente el fenotipo de células dendríticas inmaduras y maduras.....	72
La captura de los complejos glicodendrimeros/P24 favorece la migración de las células dendríticas maduras.....	73
Los glicodendrimeros no modifican la capacidad de las células dendríticas maduras de estimular la proliferación de células T	75
Los glicodendrimeros modifican el perfil de secreción de citoquinas de las células dendríticas maduras.....	76
B. CARACTERIZACIÓN DEL USO DE FOSFORODENDRÍMEROS COMO VECTORES EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	78
Los fosforodendrimeros son capaces de establecer complejos con péptidos derivados del VIH	78
Los fosforodendrimeros incrementan la captura de péptidos derivados del VIH en células dendríticas	80
Los fosforodendrimeros modifican el fenotipo de las células dendríticas inmaduras, pero no impiden la correcta maduración de las células dendríticas maduras	81
El fosforodendrimeros de segunda generación G ₂ -NH ⁺ modifica las funciones de migración y estimulación de células T en células dendríticas	82
El fosforodendrimeros G ₂ -NH ⁺ modifica el perfil de secreción de citoquinas de las células dendríticas maduras.....	84
C. ESTUDIO DEL EFECTO INMUNOESTIMULADOR EX VIVO DE COMPLEJOS ENTRE GLICO Y FOSFORODENDRÍMEROS CON PÉPTIDOS DERIVADOS DEL VIH.....	85
B- DENDRÍMEROS CARBOSILANOS COMO MICROBICIDAS FRENTE AL VIH.....	90
A. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD, SEGURIDAD Y POTENCIAL MICROBICIDA DE LOS DENDRÍMEROS G3-S16 Y G2-NF16.	90
"Screening" inicial de los dendrimeros polianiónicos carbosilanos	90
Los dendrimeros G3-S16 y G2-NF16 son biocompatibles en distintos tipos celulares	92
G3-S16 y G2-NF16 previenen de la entrada viral en células epiteliales	93
G3-S16 y G2-NF16 disminuyen la transmisión de partículas virales libres y de virus asociado a células a través de una monocapa de células epiteliales	95
Los dendrimeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 tienen un efecto protector frente a la acción disruptiva del VIH sobre monocapas epiteliales.....	97
G3-S16 y G2-NF16 tienen actividad antiviral frente a aislados primarios y de laboratorio del VIH-1 en CMSP.....	97
G3-S16 y G2-NF16 no producen proliferación ni inflamación en células primarias y líneas células humanas.....	100
Los dendrimeros G3-S16 y G2-NF16 no producen irritación ni inflamación in vivo	104
G3-S16 y G2-NF16 no afectan a la flora vaginal habitual ni tienen efecto sobre la supervivencia y motilidad espermática.....	105
La actividad antiviral de G3-S16 y G2-NF16 se mantiene en distintos pH y en presencia de plasma seminal	106
Especificidad antiviral de los dendrimeros G3-S16 y G2-NF16.....	107

B.	ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS DENDRÍMEROS G3-S16 Y G2-NF16	108
	G3-S16 y G2-NF16 actúan en los primeros pasos del ciclo viral	108
	G3-S16 y G2-NF16 son capaces de inhibir la fusión de membranas mediada por la interacción Env/CD4.....	110
	Los dendrímeros carbosilanos polianiónicos G3-S16 y G2-NF16 son capaces de inactivar a las partículas del VIH.....	111
	G3-S16 y G2-NF16 también son capaces de interaccionar inespecíficamente con distintas moléculas y marcadores de superficie de células diana de la infección.....	113
	G3-S16 y G2-NF16 impiden la transmisión viral célula-célula.....	114
	Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 dificultan la formación de las sinapsis infecciosas	117
C.	ESTUDIO DE LA EFICACIA ANTIVIRAL DE LA COMBINACIÓN DE LOS DENDRÍMEROS G3-S16 Y G2-NF16 ENTRE SÍ Y CON COMPUESTOS ANTIRRETROVIRALES.	119
	Combinaciones entre G3-S16 y G2-NF16	119
	Combinaciones entre dendrímeros y el inhibidor de la fusión Maraviroc.....	120
	Combinaciones entre dendrímeros carbosilanos e inhibidores de la transcriptasa reversa: ATZ, EFV y TFV.....	125
5.	DISCUSIÓN	138
	A-GLICODENDRÍMEROS Y DENDRÍMEROS DERIVADOS DEL FÓSFORO COMO VECTORES NO VIRALES EN INMUNOTERAPIAS FRENTE AL VIH BASADAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	138
	B- DENDRÍMEROS CARBOSILANOS COMO MICROBICIDAS FRENTE AL VIH.....	142
6.	CONCLUSIONS.....	150
	CONCLUSIONES	151
	BIBLIOGRAFÍA	152
	PÁGINAS WEB DE INTERÉS	164
	ABREVIATURAS	165
	AGRADECIMIENTOS	168
	ANEXO I	170
	ANEXO II	297

SUMMARY

Nanotechnology offers novel suitable tools in order to develop new therapies and preventive strategies against HIV, such as dendrimers.

Dendritic cells (DC), which play a major role in development of cell-mediated immunity, represent opportunities to develop novel anti-HIV vaccines. Dendrimers have been proposed as new carriers to ameliorate DC antigen loading and in this way, the potential use of maltose decorated glycodendrimers as well as cationic phosphorus dendrimers have been determined. Thus, immunostimulatory properties of these dendrimers on human DC were evaluated in the context of HIV infection.

We have demonstrated that DC treated with glycodendrimers were fully functional with respect to viability and maturation. Moreover, positively charged glycodendrimers in association with HIV-derived peptides were able to increase the uptake of these peptides into DCs in comparison with HIV-derived peptides alone. Nevertheless, iDC and mDC phenotypes as well as mDC functions such as migration ability and cytokines profile production were changed, showing a more activated immune profile.

On the other hand, phosphorus dendrimers showed ability to deliver HIV-derived peptides in DC, but they induced important changes in phenotype. Moreover, the treatment of mDC with the second generation phosphorous dendrimer and derivated dendriplexes modified cellular migratory properties, altered their capacity to stimulate allogenic naïve T cells *in vitro* and impeded the production of pro-inflammatory cytokines, suggesting a tolerogenic profile of treated DC. Thus, phosphorus dendrimers could not be used as vaccines because they would not have the ability to induce an immune response.

Summing up, our results showed the potential carrier properties of glycodendrimers to activate the immune system by the way of DC stimulation. In case of phosphorous dendrimers, although they were not able to induce immune response, our data suggest that there are other potential therapeutic applications of these compounds, for instance as topical anti-inflammatory agents, as compounds for allograft rejection or autoimmune diseases and as agents inducing specific tolerance with antigen-loaded DC against allergy reaction. Nevertheless, these applications need to be evaluated.

Furthermore, self-administered topical microbicides and oral pre-exposure prophylaxis are researched as potential tools in order to stop the HIV sexual spreading in women and homosexual collectives.

Sulphated and naphthylsulfonated functionalized carbosilane dendrimers G3-S16 and G2-NF16 have shown as safety and effective compounds against HIV with great potential as topical microbicides. These dendrimers have a great capacity to block HIV entry inside epithelial cells probably due to their ability to protect the epithelial monolayer from cell disruption. In addition, they impede laboratory and clinical primary HIV-1 isolates infection in activated PBMC and inhibit HSV-2 infection *in vitro*. G3-S16 or G2-NF16 did not produce changes in proinflammatory cytokines profile in treated epithelial cells, in PBMC proliferation, microbiota or sperm survival. Moreover, no irritation,

inflammation or vaginal lesions were detected in female CD1(ICR) mice after dendrimers vaginal administration.

Due to the fact that most of the single effective topical microbicides have failed in clinical trials, combinatorial strategies could be developed as valid approaches in the design of new microbicides. Therefore, we evaluated various combinations of anionic carbosilane dendrimers G3-S16 and G2-NF16 with different antiretrovirals (ARV) against X4 and R5 viral strains in TZM.bl human cell line and PBMC. G3-S16 and G2-NF16 dendrimers showed a synergistic or additive activity profile with zidovudine, efavirenz, maraviroc and tenofovir in the majority of combinations tested against X4 and R5 tropic HIV-1 in cell lines as well as in primary human cells.

In addition, we analyzed the mechanism of action of these carbosilane dendrimers. We demonstrated that they were able to inhibit viral infection at fusion and thus at the entry step. Both compounds impede the binding of viral particles to target cell surface and membrane fusion, suggesting that they block gp120/CD4 interaction. In addition, and for the first time, we demonstrated that dendrimers can inhibit cell-to-cell HIV transmission and difficult infectious synapse formation. Thus, we propose that carbosilane dendrimers' mode of action is a multifactorial and unspecific process including several proteins from viral envelope as well as from host cell.

Summing up, these promising results suggest that G3-S16 or G2-NF16 and their combinations with ARV can be effective antiviral agents, supporting further clinical research on these as potential microbicides in the context of blocking HIV-1 sexual transmission.

RESUMEN

La Nanotecnología ha permitido la aparición de nuevos nanomateriales y herramientas, como los dendrímeros, útiles en el desarrollo de nuevas terapias y estrategias preventivas frente al VIH.

El uso de células dendríticas (CD), células presentadoras de antígeno con un papel fundamental en el establecimiento de la respuesta inmune celular, se está evaluando como una potencial estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas. A su vez, en el marco de la búsqueda de nuevas estrategias de vacunación más efectivas contra el VIH, los dendrímeros se han propuesto como nuevos vectores para el transporte y liberación de biomoléculas que permitan mejorar la captura y presentación antigénica por parte de las CD. Por ello, se ha evaluado el potencial inmunoestimulador de glicodendrímeros decorados con maltosa y fosforodendrímeros como agentes transportadores de péptidos derivados del VIH, con el fin de incrementar la captura antigénica e inmunoestimulación de las CD, y por tanto, desencadenar una respuesta inmunológica más potente en el contexto de la infección por el VIH.

Se ha demostrado como el tratamiento de las CD con ambos tipos de dendrímeros no afecta a su viabilidad ni a su capacidad de maduración. Además, tanto los glicodendrímeros catiónicos como los fosforodendrímeros, en asociación con péptidos derivados del VIH, permiten y facilitan una mayor captura de estas moléculas por parte de las CD en comparación a cuando estos péptidos no se encuentran complejados con las nanopartículas. Sin embargo, el fenotipo de las CD inmaduras y maduras, así como sus principales funciones, tales como su capacidad de migración o de expresión y secreción de citoquinas, se ven afectados cuando éstas son tratadas con los glicodendrímeros catiónicos, mostrando un estado de activación e inmunoestimulación. En el caso de los fosforodendrímeros, éstos inducen importantes cambios en el fenotipo de las CD, alterando también sus propiedades migratorias, su capacidad para estimular la activación y proliferación de células T *in vitro* e impidiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que sugiere la inducción de un perfil tolerogénico en las CD.

Estos resultados muestran el potencial de los dendrímeros decorados con azúcares como transportadores de biomoléculas para la mejora de la captura antigénica y la activación del sistema inmune a través de la estimulación de las CD. En el caso de los fosforodendrímeros, éstos inducen unos cambios en la funcionalidad de las CD que impiden su uso en estrategias de vacunación frente al VIH. Sin embargo, las características tolerogénicas de las CD tratadas con fosforodendrímeros, sugiere otras posibles aplicaciones terapéuticas de los mismos, ya sea como agentes antiinflamatorios, compuestos que permitan prevenir la aparición de rechazos en procesos de trasplante o agentes inductores de tolerancia en diversos procesos de alergia, aunque se requieren nuevas investigaciones que confirmen estos hechos.

Además, otras estrategias, como el desarrollo de microbicidas de uso tópico o métodos de profilaxis pre-exposición, se están investigando para la búsqueda de nuevas herramientas que permitan poner freno a la transmisión por vía sexual del VIH, especialmente en mujeres y colectivos homosexuales.

Los dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano G3-S16 y G2-NF16 mostraron una gran biocompatibilidad, alta actividad anti-VIH y una potencial aplicación como microbicidas de uso tópico en la prevención de la transmisión sexual del VIH. Estos dendrímeros tuvieron una gran capacidad para bloquear la entrada viral en el interior de células epiteliales y, además, presentaron una acción protectora frente a la disrupción de las monocapas epiteliales ocasionada por el VIH. Los dendrímeros impidieron también la infección *in vitro* de células primarias y líneas celulares por diversos aislados primarios y de laboratorio del VIH-1 y por el VHS-2. Estos compuestos no produjeron cambios en los perfiles de producción de citoquinas de las células epiteliales, en la proliferación celular, en la microbiota vaginal o en la supervivencia espermática. Además, no se detectó irritación, inflamación o lesiones vaginales en hembras de ratones de la cepa CD1(ICR) tras la administración vaginal de estos dendrímeros, lo que demuestra su seguridad y los convierte en magníficos candidatos a microbicidas.

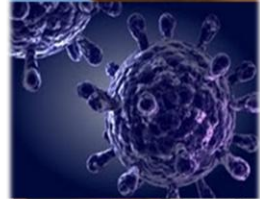
Sin embargo, debido al fracaso de la mayoría de ensayos clínicos basados en el uso de moléculas simples, se ha postulado el desarrollo de estrategias combinatorias entre diferentes agentes antirretrovirales como una aproximación válida para el diseño de nuevos microbicidas. Se evaluaron diferentes combinaciones de estos dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano con distintos antirretrovirales (ARV) frente a distintos aislados virales, tanto en células primarias como en líneas celulares. Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 mostraron una actividad sinérgica o aditiva con los ARV zidovudina, efavirenz, maraviroc y tenofovir en la mayoría de las combinaciones probadas, tanto frente a aislados X4, R5 como con tropismo dual.

Además se ha estudiado el mecanismo de acción de estos dendrímeros. Se ha visto como los compuestos G3-S16 y G2-NF16 inhiben la infección viral a nivel de la entrada, actuando sobre distintas proteínas de la superficie viral y de la célula hospedadora, lo que impide la fusión de membranas a través de un bloqueo de la interacción gp120/CD4. Además, y por primera vez, hemos demostrado como los dendrímeros pueden inhibir la transmisión del VIH célula-célula y dificultan la formación de sinapsis infecciosas. Por tanto, los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 presentan un mecanismo de acción inespecífico y multifactorial, debido a su unión a diversas proteínas tanto de la envuelta viral como de la membrana de la célula susceptible de infección.

Los prometedores resultados obtenidos con los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16, así como sus combinaciones con ARV, apoyan el desarrollo de nuevas investigaciones para evaluar su potencial microbicida en modelos *in vivo* para la prevención de la propagación del VIH.

INTRODUCCIÓN

1



**STOP
AIDS**
GET TESTED

INTRODUCCIÓN

VIH y SIDA: aspectos generales de la epidemia

Según los últimos datos disponibles, en 2011, el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida Humana (SIDA) se cobró la vida de más de 1,7 millones de personas en todo el mundo¹ (Fig. 1). Desde 1983, año de descubrimiento de la enfermedad, son alrededor de 30 los millones de vidas que se han perdido por esta epidemia^{2,3}. Por ello, es de vital importancia no cesar en la lucha y no escatimar esfuerzos en la búsqueda de nuevas terapias, tratamientos y métodos de prevención más efectivos frente a la infección.

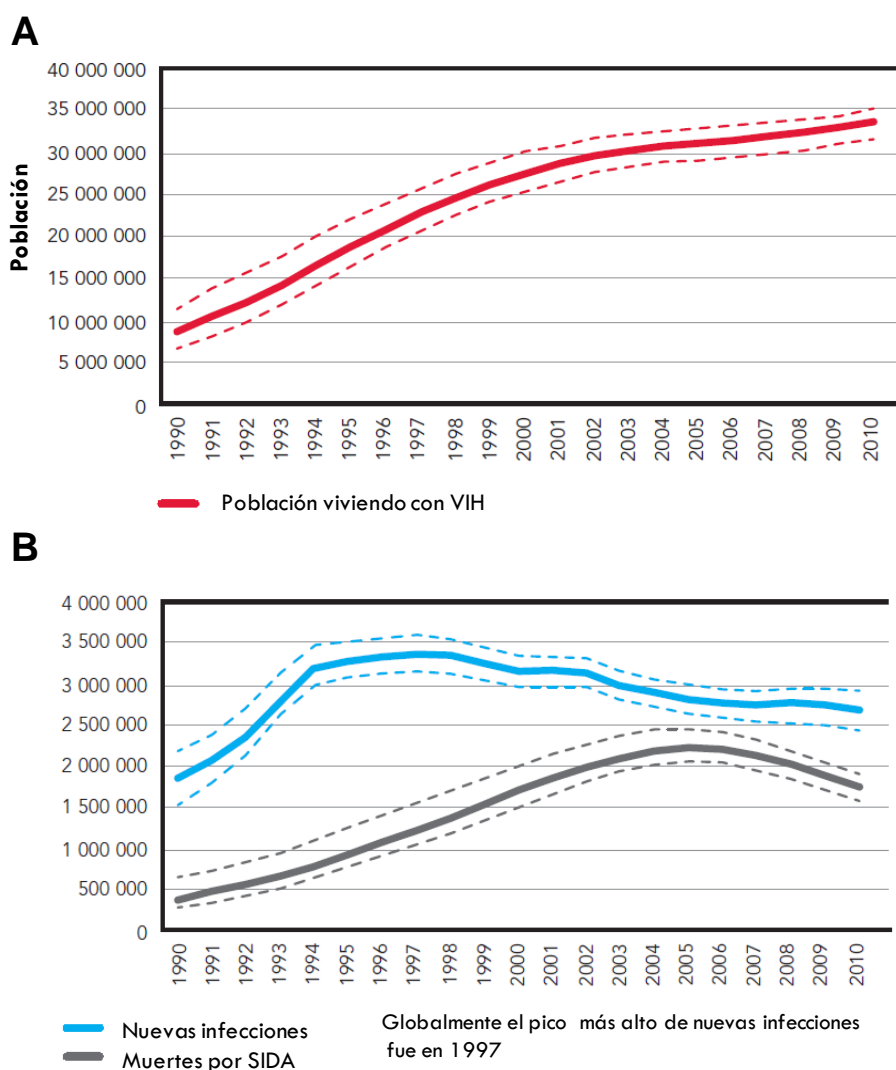


Figura 1. Evolución del número de personas infectadas (A), nuevas infecciones por el VIH y muertes por el SIDA (B) a nivel mundial en los últimos 20 años. Datos actualizados en el año 2010. Fuente: ONUSIDA

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente etiológico causante del SIDA (Fig. 2). Se trata de un retrovirus de ARN de cadena sencilla con un tamaño en torno a los 100nm⁴. Su genoma se encuentra en el interior de una cápside proteica, que a su vez se encuentra rodeada por una envuelta lipídica rica en glicoproteínas, algunas de ellas esenciales en los procesos iniciales de

infección viral como la gp120 o la gp41^{5,6}. Existen dos tipos de VIH, VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es el más virulento y es el principal causante de infecciones a nivel mundial, existiendo diferentes subtipos^{8,9}. El subtipo B es el más prevalente en los países occidentales, mientras que el C es el más abundante en África, donde se concentran la mayor parte de las infecciones. El VIH-2 se encuentra distribuido principalmente en las regiones del África Occidental¹⁰.

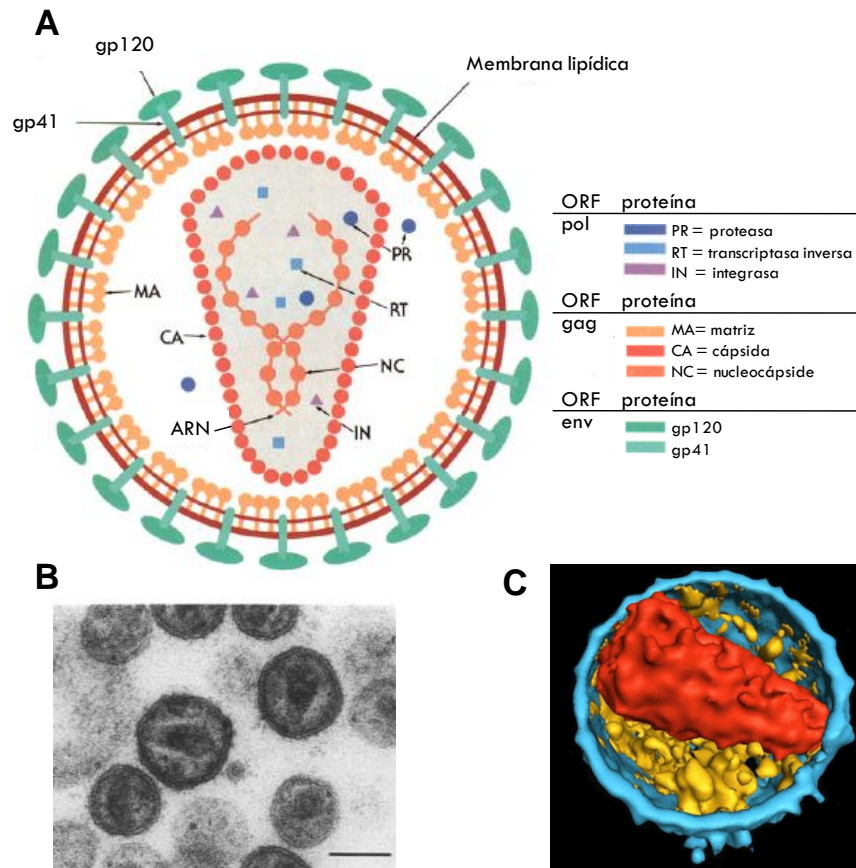


Figura 2. Estructura del VIH (A). El genoma viral, constituido por ARN, contiene principalmente tres ORF, env, gag y pol, que codifican para distintas proteínas estructurales imprescindibles para la replicación del VIH. (B) Imagen de microscopía electrónica de una partícula del VIH. La barra indica un tamaño de 100nm. (C) Reconstrucción tridimensional de la estructura de una partícula viral. En rojo se representa la cápsida, en azul la envuelta y en amarillo la matriz. Fuente: Adaptado de <http://www.chm.tcu.edu> y Briggs, J. 2006

La principal diana del VIH son los linfocitos T CD4+ presentes en el torrente sanguíneo y en los ganglios linfáticos, aunque también son susceptibles de infección otros tipos celulares como células dendríticas (CD) o macrófagos. La consecuencia final de la infección por el VIH es un estado de inmunosupresión caracterizado por valores bajos de linfocitos T CD4+. Esta inmunosupresión favorece la aparición de enfermedades oportunistas, que en numerosas ocasiones conducen a la muerte del individuo^{8,11}.

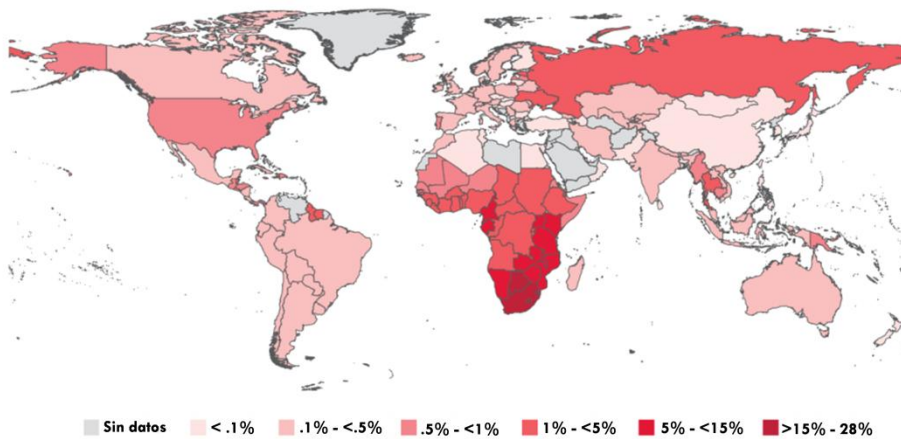
El principal mecanismo de transmisión del VIH es el contacto directo entre fluidos biológicos con alta carga viral. Este virus se ha detectado en humanos en diversos fluidos corporales tales como la saliva, las lágrimas, el semen y el líquido preseminal, la orina, la leche materna, el líquido cefalorraquídeo y, principalmente, en la sangre¹¹.

Existen tres rutas principales de transmisión del VIH: i- la sexual, a través del contacto de secreciones infectadas con mucosas de la zona genital o rectal; ii- la parenteral, debido por ejemplo al uso de jeringuillas contaminadas o a la realización de transfusiones con sangre infectada; y iii- la vertical, en la cual el virus pasa de madres a hijos durante el embarazo, el parto o a través de la leche materna¹²⁻¹⁵.

Según datos de ONUSIDA en su último informe anual, en 2011, alrededor de 34 millones de personas se encontraban infectadas por el VIH/SIDA a nivel mundial (se cree que la mitad de ellas no conocían su verdadero estado serológico)¹ (Fig. 1). La mayor parte de estas infecciones se concentran en áreas en vías de desarrollo con altos índices de pobreza como el África Subsahariana (23,5 millones), agravando mucho más aún el drama mundial que supone esta enfermedad^{3,16} (Fig. 3). A pesar de los esfuerzos internacionales y locales, que han permitido reducir el número de muertes por el VIH/SIDA en 600.000/año en comparación con los datos de 2005, aún se produce la cifra alarmante de 2,5 millones de nuevas infecciones anuales¹.

La llegada de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) en 1996 y el desarrollo de nuevos antirretrovirales (ARV) han supuesto un cambio radical en la vida de los individuos con VIH/SIDA, permitiendo controlar sus valores de carga viral, y mejorando su calidad y esperanza de vida¹⁷. El VIH ha dejado de ser mortal, al menos en los países con acceso a los tratamientos antirretrovirales; sin embargo, a nivel global, no es una enfermedad curable. A pesar de ello, hay espacio para la esperanza, habiéndose reportado ya los primeros casos excepcionales de curación de la enfermedad tras un trasplante de médula, tres de ellos en adultos (dos en Boston y uno en Alemania) y uno en niños¹⁸. El primer caso de curación anunciado a nivel mundial fue el del famoso “paciente de Berlín”, en el que tras un trasplante alogénico con células hematopoyéticas con la mutación delta 32 en el correceptor CCR5 (uno de los implicados en los primeros pasos de la entrada viral) se consiguió una “cura funcional” del VIH^{19,20}. Cinco años después del trasplante, el paciente presenta unos valores de carga viral en sangre indetectables aún sin estar sometido a ningún tratamiento antirretroviral. Estos resultados abren nuevas oportunidades de tratamiento, pero es aún pronto para sacar conclusiones definitivas, requiriéndose un seguimiento continuado de estos pacientes en el futuro con el fin de evaluar si los niveles de virus continúan disminuidos o por el contrario podría producirse una reactivación viral en algún reservorio.

A



B

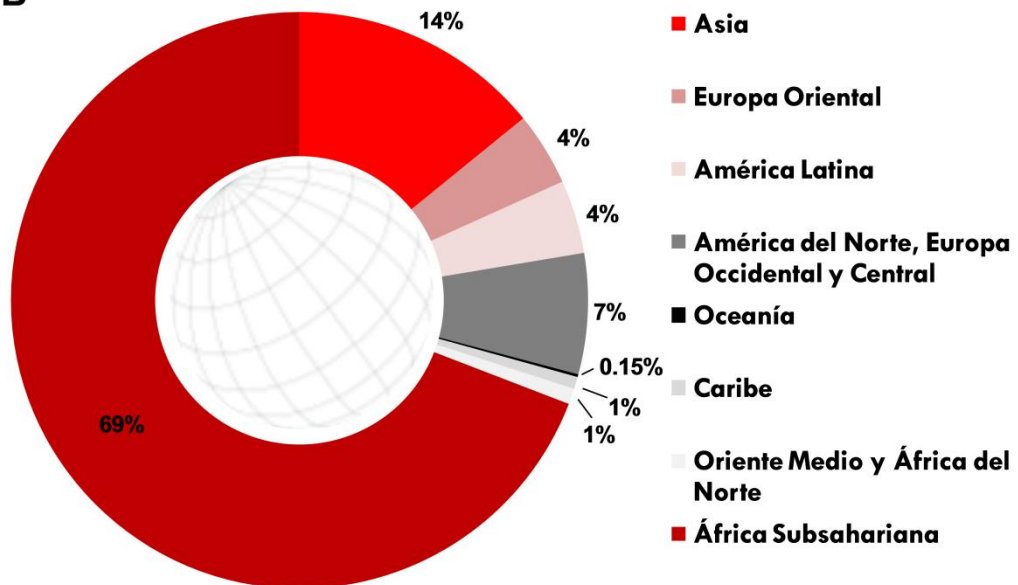


Figura 3. Prevalencia del VIH a nivel mundial. **(A)** Incidencia de la infección por países en 2010. **(B)** Prevalencia de la enfermedad por regiones en el año 2012. La mayor parte de las personas infectadas se localizan en los países del África subsahariana, con cerca de un 70% del total de infecciones. Fuente: ONUSIDA

Lucha contra el VIH: nuevas estrategias

La mayor parte de los esfuerzos por parte de la comunidad científica y médica se encaminan al desarrollo de estrategias preventivas que permitan controlar la propagación y transmisión del VIH^{12,21,22}. Esto está en concordancia con la estrategia “Getting to zero (Llegar a 0)” propuesta por ONUSIDA y la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el periodo 2011-2015, cuyo objetivo es reducir a la mitad el número de nuevas infecciones por el VIH, especialmente las producidas por transmisión sexual, que constituyen un 80% del total²³.

Estas estrategias de prevención de la infección se agrupan principalmente en cuatro grupos:

-**Vacunas:** todavía no se ha conseguido desarrollar una vacuna eficaz frente al VIH¹¹. Sin embargo, ésta sería la mejor estrategia a largo plazo para acabar con la epidemia.

-**Microbicidas:** son geles, cremas o espumas que aplicados por vía vaginal o rectal impiden la transmisión sexual del VIH.

-**Profilaxis pre-exposición (PrPE):** estrategia preventiva basada en el tratamiento de poblaciones de riesgo con ARV de manera previa al contacto con el virus, lo que supondría una ventaja de estos frente al VIH en el momento de la infección, evitándose la replicación viral, y consiguiendo así frenar la infección. La PrEP debe ser utilizada constantemente para ser eficaz, por lo que su protección está íntimamente relacionada con los niveles de adherencia a los ARV.

-**Otras áreas de investigación:** agrupa estrategias encaminadas a evitar la transmisión vertical, mecanismos de intervención para drogodependientes, programas de educación sexual para la infancia, etc.

Hasta ahora, la táctica más exitosa ha sido el desarrollo de estrategias de PrPE²⁴⁻²⁸. En 2011, dos ensayos clínicos, TDF2 y Partners PrEP study^{29,30}, demostraron la eficacia de la administración por vía oral de tenofovir (TFV) o la combinación de TFV con emtricitabina en la prevención de transmisión del VIH entre mujeres y colectivos homosexuales en África. Esto permitió que en 2012 la “Food and Drug Administration” (FDA) aprobara el fármaco denominado Truvada (tenofovir difumarato+emtricitabina) como uso preventivo frente a la infección por el VIH³¹. Estos métodos de PrPE disminuyen las tasas de infección, pero no eliminan totalmente el riesgo, por lo que no deben nunca pasar a convertirse en la primera línea de defensa contra la infección, debiéndose utilizar siempre en combinación con otros métodos preventivos como el preservativo. Además los posibles efectos secundarios derivados del uso continuado de estos ARV deben servir como señal de atención a la hora de desarrollar este tipo de estrategias²⁹.

Esta Memoria se centra sobre todo en desgranar los más recientes avances en el desarrollo de vacunas y de microbicidas como medidas preventivas o de tratamiento frente a la infección por el VIH.

Vacunas frente al VIH

Las vacunas, tradicionalmente, son herramientas efectivas de salud pública que históricamente han permitido erradicar o disminuir drásticamente algunas enfermedades infecciosas. Ninguna vacuna es 100% efectiva, pero valores de protección de entre 70-95% se consideran más que aceptables. Además su relación coste-efecto, ofreciendo protección durante varios años con una o pocas inmunizaciones las hace altamente atractivas.

El objetivo de la vacunación o inmunización es “adiestrar” al sistema inmune, preparándolo para combatir a un determinado patógeno incluso antes de haber entrado en contacto con él (vacuna preventiva). Mediante la vacunación con distintos antígenos del patógeno en cuestión, se consigue desarrollar una inmunidad específica y de tipo memoria frente a una futura infección por el mismo que

nos permita responder antes y de una manera mucho más efectiva. Así, enfermedades como la polio, el sarampión o la varicela han sido prácticamente erradicadas a nivel global.

La consecución de una vacuna preventiva frente al VIH sería la estrategia más eficaz para conseguir acabar con el virus a largo plazo. En los círculos científicos, la vacuna aparece como el método crucial para frenar el VIH/SIDA, a través de una disminución sostenida del número de infecciones que lleve incluso a la erradicación de la enfermedad^{32,33}. Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos realizados con vacunas preventivas frente al VIH desde hace casi treinta años han sido estériles o poco efectivos^{32,34-38}.

Por otra parte, las vacunas terapéuticas, orientadas a personas ya infectadas, tienen como objetivo incrementar el control y la eliminación del VIH mediante el desencadenamiento de una inmunidad humoral y celular específica.

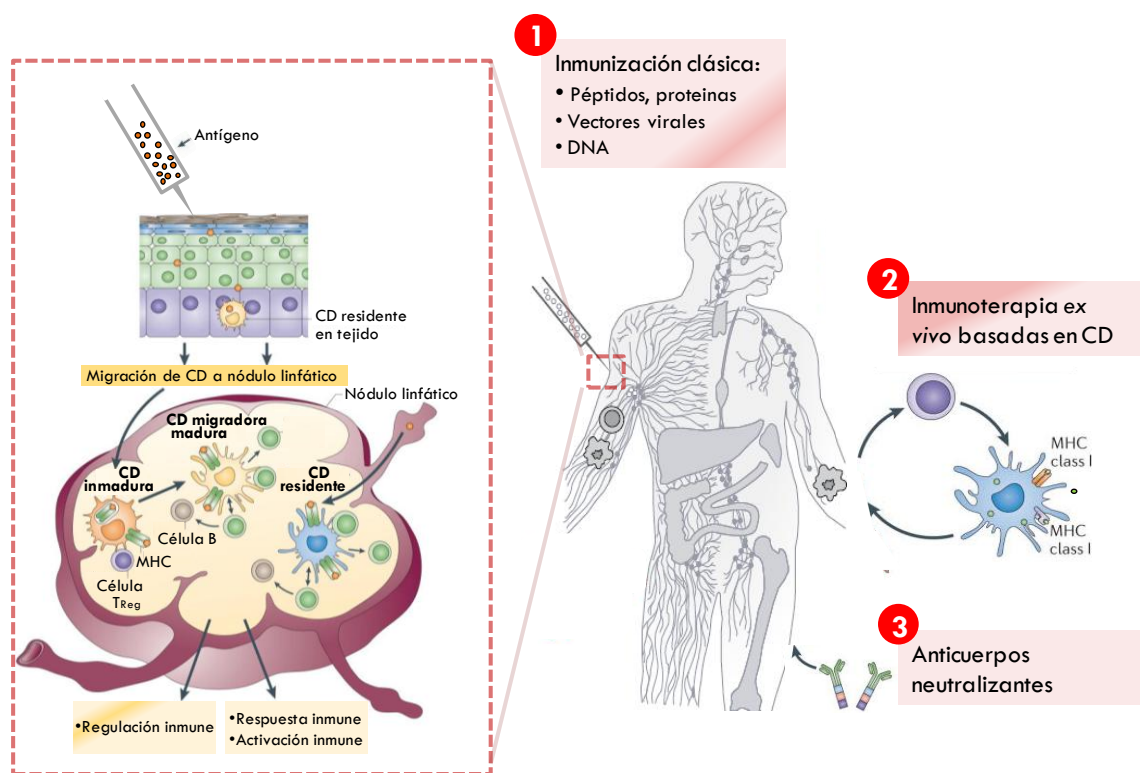


Figura 4. Estrategias en el diseño de vacunas contra el VIH-1. Se han empleado diferentes aproximaciones de inmunización en la búsqueda de una vacuna eficaz contra el VIH. En la actualidad la mayor parte de ellas se centran en la inmunización con péptidos antigénicos o vectores virales, ADN, etc., expresando antígenos virales. El objetivo es desarrollar una respuesta celular y humoral específica frente al virus mediada en primera instancia por células dendríticas (CD). Otras estrategias en estudio son inmunoterapias basadas en la activación ex vivo de CD o vacunas pasivas con anticuerpos neutralizantes de amplio espectro. Fuente: Adaptado de Palucka, K., 2012

En estas inmunoterapias se están utilizando diferentes estrategias para encontrar antígenos recombinantes realmente potentes que sean usados como inmunógenos (Fig. 4). Vacunas con plásmidos de ADN que expresan diversos antígenos virales como gag, nef, env o pol, proteínas virales, mezclas de péptidos o partículas virales inactivadas han sido algunos de los métodos empleados hasta ahora³⁹⁻⁴¹. También se han usado vectores virales modificados expresando antígenos del VIH, como

Poxvirus, “Modified Vaccinia Ankara” (MVA) o adenovirus como estrategias de vacunación, con resultados diversos y en ocasiones poco concluyentes⁴²⁻⁴⁴.

En los últimos años algunas inmunoterapias han llegado a diferentes fases de ensayos clínicos (Fig. 5). Sin embargo, solo uno de ellos, el RV 144, en el que se usó un poxvirus que expresaba los genes de la gp120 y gp41 del subtipo E, gag y la proteasa del subtipo B, así como un refuerzo (“boost”) con gp120 recombinante, mostró evidencias positivas (efecto moderado del 31,2%)^{45,46}. Este ensayo, realizado en Tailandia y en el que se reclutaron más de 16.000 personas es la evidencia de que una vacuna contra el VIH/SIDA es posible. Sin embargo, fallos recientes como el del ensayo HVTN 505, que detuvo las inmunizaciones en abril de este año debido a la falta de efectividad, hace necesario que se destinen más esfuerzos y recursos al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas^{47,48}. Actualmente, hay más de una veintena de nuevas vacunas que están siendo probadas como vacunas candidatas frente al VIH en ensayos clínicos de Fase I y II a lo largo del mundo implicando nuevas estrategias⁴⁹ (Fig. 6). Además, se está diseñando un nuevo ensayo clínico denominado “P5” (Pox Protein Public Private Partnership trial), que parte de los resultados obtenidos en el ensayo clínico RV 144, con el fin de incrementar la eficacia de esta vacuna⁴⁹.

2003/2004

VaxGen	×	Vacuna basada en proteínas, candidata en dos ensayos clínicos (uno de EE.UU, Canadá, Holanda y Puerto Rico, y otro en Tailandia); los resultados mostraron falta de eficacia .
---------------	---	---

2007

Step	×	Vacuna basada en adenovirus Ad5 y probada en dos ensayos diferentes: Step en Australia, Brasil, Canadá, República Dominicana, Haití, Jamaica, Perú, Puerto Rico y Estados Unidos, y Phambili en Sudáfrica; ambos se pararon de forma prematura debido a que no mostraban ningún tipo de eficacia .
Phambili	×	

2009

RV144	+	Vacuna con un vector de tipo Poxvirus + “boost” proteico en Tailandia; tras 3 años de seguimiento mostró una eficacia de 31.2%
--------------	---	---

2013

HVTN 505	×	Vacuna de ADN+ “boost” basado en adenovirus Ad5, probada en Estados Unidos; ensayo suspendido prematuramente debido a la falta de eficacia .
-----------------	---	---


	Proteína		Poxvirus		Adenovirus		ADN
---	----------	---	----------	---	------------	---	-----

Figura 5. Principales ensayos clínicos en humanos para la evaluación de vacunas frente al VIH. Hasta ahora, sólo el RV144 ha mostrado un resultado positivo moderado. Cada código de color representa una estrategia diferente. Fuente: <http://www.avac.org/>

A

Estrategia	Fase I	Fase Ib	Fase II	Fase IIb/III
Poxvirus	MVA (MHRP, EDCTP, SAAVI, GeoVax, HVTN, Oxford) NYVAC (HVTN)		MVA (EDCTP, GeoVax)	
Proteína	AIDSVAX (HVTN) gp140 (Novartis, HVTN, SAAVI) gp120 (GSK) gp41 (EC) mAb (Rockefeller) Tat Protein (Istituto Superiore di Sanita, Novartis)		VICHERPOL (Russian Federation)	ALVAC AIDSVAX (MHRP)
ADN	DNA plasmid (HVTN, GeoVax, Oxford) PENNVAX (MHRP) HIV-MAG (HVTN, IAVI) HIVIS (EDCTP) IL-12 pDNA (HVTN) SAAVIDNA-C2 (SAAVI, HVTN)		HIVIS (EDCTP) GTU-Multi (ANRS)	
Adenovirus	rAd5 (HVTN, Brigham) rAd35 (HVTN, IAVI) rAd26 (Brigham) ChAdV63.HIVcons (Oxford)			
Lipopéptido			HIV-LIPO-5 (ANRS)	
Virus Sendai	Sendai SeV-G (IAVI)			
Vector viral replicativo			rTV (NCAIDS/China)	
VIH-1	HIV-1 delta (Istituto Superiore di Sanita)			
Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV)	VSV Indiana HIV gag (HVTN)			

B

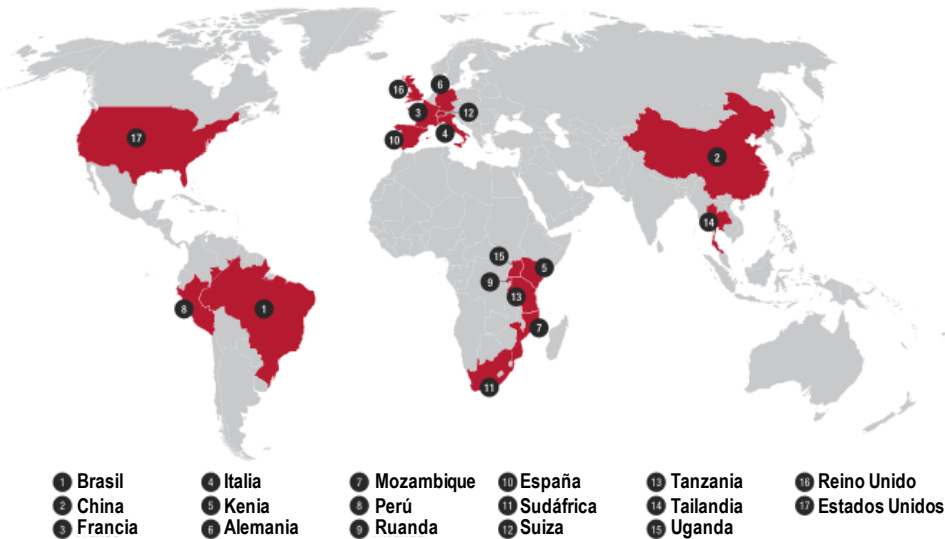


Figura 6. Diferentes estrategias de vacunas frente al VIH actualmente en ensayo clínico (actualizado a abril de 2013). **(A)** Distintas aproximaciones basadas en vectores virales, proteínas y péptidos inmunogénicos o ADN se encuentran actualmente en distintas fases de ensayo en humanos. La vacuna más avanzada es un futuro ensayo clínico Fase IIb/III combinando Poxvirus y proteína. Cada color indica una estrategia diferente. **(B)** Países participantes en ensayos clínicos de vacunación frente al VIH actualmente en seguimiento. Fuente: <http://www.avac.org/>

Técnicas nuevas de “screening” o cribado han permitido el descubrimiento de nuevos anticuerpos neutralizantes de amplio espectro con alta capacidad de bloquear el VIH, similares a los que se encuentran en los individuos VIH+ controladores de élite⁵⁰⁻⁵². Estos anticuerpos neutralizantes podrían utilizarse directamente en vacunas pasivas o podrían usarse como “moldes” para la creación de epítomos inmunogénicos, que expresados por vectores, pudieran desencadenar la producción específica de este tipo de anticuerpos por parte de las células B de la inmunidad adaptativa. En consonancia con esto, ensayos usando vectores que expresan algunos de estos anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a diversos epítomos de gp120, como la región V3, presentaron resultados positivos previniendo la infección por el VIH/SIV en primates no humanos y en ratones humanizados^{53,54}.

Junto con todas estas estrategias, también se han ensayado inmunoterapias basadas en CD como métodos de vacunación frente al VIH en diversos modelos animales y en humanos^{39,55-58} (Fig. 4). Estas células, con un papel esencial de nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa, tienen la capacidad de captar y procesar antígenos proteicos y presentarlos a través de las moléculas de MHC de clase I y II permitiendo la estimulación específica de los linfocitos T CD8 y T CD4, respectivamente^{59,60}. Las CD pueden ser activadas *ex vivo* con diferentes antígenos derivados del VIH y ser de nuevo introducidas en el paciente VIH+ para desencadenar una respuesta específica y potenciada frente al virus^{58,61}. Estas inmunoterapias basadas en CD se han utilizado previamente con éxito en el tratamiento de otros tipos de patologías como el cáncer⁶²⁻⁶⁵.

En el caso del VIH, se han utilizado distintas estrategias para la estimulación de las CD con los antígenos: desde péptidos, proteínas completas, virus inactivados o células apoptóticas hasta su transfección con ARNm o ADN expresando antígenos virales en vectores virales⁶⁶⁻⁷³. En todos los estudios se han obtenido resultados modestos en lo que concierne a la inhibición de la infección por el VIH.

Los mejores resultados se han obtenido en ensayos clínicos de vacunas terapéuticas realizados con virus completos inactivados. Lu y colaboradores, utilizando virus autólogo inactivado por aldritol-2 y CD pulsadas con IL-4 mostraron una supresión viral superior al 90% en 8 de los 18 pacientes VIH+ incluidos en su ensayo de vacunación, llevado a cabo en China⁷⁴. En otro ensayo realizado en España, García y colaboradores, pulsando CD con virus autólogo inactivado por calor, obtuvieron un control parcial del VIH en los 12 pacientes estudiados a las 24 semanas post-vacunación⁷⁵⁻⁷⁷.

En estos ensayos experimentales basados en inmunoterapias con CD se han reclutado aproximadamente 210 pacientes VIH+ (150 en tratamiento con TARGA y 60 naïve al tratamiento antirretroviral). Aunque el perfil de seguridad fue excelente y la inmunización generó respuestas específicas frente al VIH, únicamente en cuatro de estos estudios se observó una respuesta a la inmunización que permitía controlar la viremia^{39,71}. Esto se debe a que las terapias basadas en CD presentan una serie de puntos críticos que deben analizarse minuciosamente para un adecuado desarrollo de las mismas como inmunovacunas. Algunos de ellos son: la elección del antígeno diana, el método de inactivación del virus, el procedimiento de obtención de las CD *ex vivo* y su estado de maduración y/o la determinación del método de vacunación (dosis de antígeno, ruta de administración, frecuencia de las inyecciones, etc.)^{37,60,78,79}.

Unidos a estos factores, hay otros parámetros que dificultan enormemente el desarrollo de vacunas eficaces frente al VIH. Uno de los factores primordiales es que la principal diana del virus son las propias células del sistema inmune. Aunque el sistema inmune es capaz de combatir en un primer momento al VIH, la progresiva disminución en los valores de linfocitos T CD4+ dificulta la aparición de respuestas específicas potentes frente al mismo. Además, la hiperactivación generalizada del sistema inmunológico debida al VIH conlleva un agotamiento del mismo que impide el desencadenamiento de respuestas eficaces y específicas, no solo frente al virus, sino frente a otros patógenos oportunistas. A esto se une la altísima capacidad de mutación del VIH, lo que complica la búsqueda de antígenos diana eficientes. Recientemente, se ha mostrado una asociación entre el control viral y las respuestas específicas CD4/CD8 frente a la proteína gag del VIH, pero no frente a la proteína env, lo que indica que la búsqueda de respuestas se deben llevar a cabo frente a las estructuras más conservadas del virus^{39,80,81}. El desarrollo de secuencias mosaico de diversos antígenos también supone un arma a la hora de limitar la variabilidad y evitar el escape inmune. La utilización de adyuvantes que aumenten la calidad y la respuesta frente al VIH, sin inducir activación específica del sistema inmune, también es vital para mejorar las técnicas de vacunación^{32,38,82}. Además, hay que tener en cuenta las diversas vías de transmisión del VIH como una dificultad más en el desarrollo de vacunas efectivas.

En la búsqueda de la ansiada cura funcional del VIH parece esencial que, en el caso de las vacunas terapéuticas cuyo objetivo es un control sostenido del virus en el tiempo, éstas sean combinadas con otras estrategias, como el uso de drogas que permitan eliminar la latencia viral, con el fin de conseguir una total erradicación del virus de los diferentes reservorios⁸³.

Desde 2001 se han invertido más de 8 billones de \$ en la búsqueda de una vacuna preventiva frente al VIH⁴⁹. Solo en 2011 se invirtieron 845 millones. En 2007 24.758 personas fueron reclutadas en diversos ensayos clínicos en todo el mundo. En 2013 ya son más de 8.000 individuos los participantes. Seguramente no se tendrá una vacuna frente al VIH en los próximos 5 años, o quizá en los próximos 10 años, pero todos los esfuerzos llevados a cabo por parte de organizaciones internacionales, gobiernos y científicos son necesarios y justificables si el objetivo último es frenar una enfermedad que mata a millones de personas anualmente.

Microbicidas

El 50% de la población infectada por el VIH a nivel mundial son mujeres¹ (Fig. 7). Este colectivo, especialmente en los países en vías de desarrollo, es uno de los más vulnerables frente a la infección por el VIH debido a diversos factores, tanto sociales como culturales. Este problema es especialmente importante en África subsahariana donde 6 de cada 10 individuos infectados por el VIH son mujeres, existiendo entre las mujeres jóvenes de entre 15 y 24 años el doble de posibilidades de infectarse con el virus en comparación con los hombres de la misma edad. Además, la infección por el VIH/SIDA se ha convertido en la primera causa de mortalidad entre las mujeres de 15 a 44 años. Todo esto se traduce en 3.000 nuevas mujeres infectadas cada día, siendo en un 80% de los casos por vía sexual¹. Por lo tanto, es urgente e imprescindible el desarrollo de sistemas de prevención que permitan frenar la transmisión del VIH, especialmente por vía sexual, en los grupos más desfavorecidos.

Una de las estrategias en desarrollo más avanzadas es la búsqueda de microbicidas, compuestos que aplicados vía tópica en forma de geles vaginales o rectales, anillos u otras formulaciones, prevengan la infección por el VIH desde sus primeras fases^{34,84-92}. Los microbicidas tienen gran potencial porque, en caso de ser eficaces, supondrían una ventaja frente a otros métodos preventivos, como el preservativo, al ser más fáciles de utilizar y no ser necesario que la mujer tenga que negociar su uso, poniendo en sus manos la capacidad de poder decidir su utilización. Además sería un arma potente para combatir la infección por el VIH en grupos especialmente expuestos como las mujeres que ejercen la prostitución o las mujeres víctimas de violaciones.

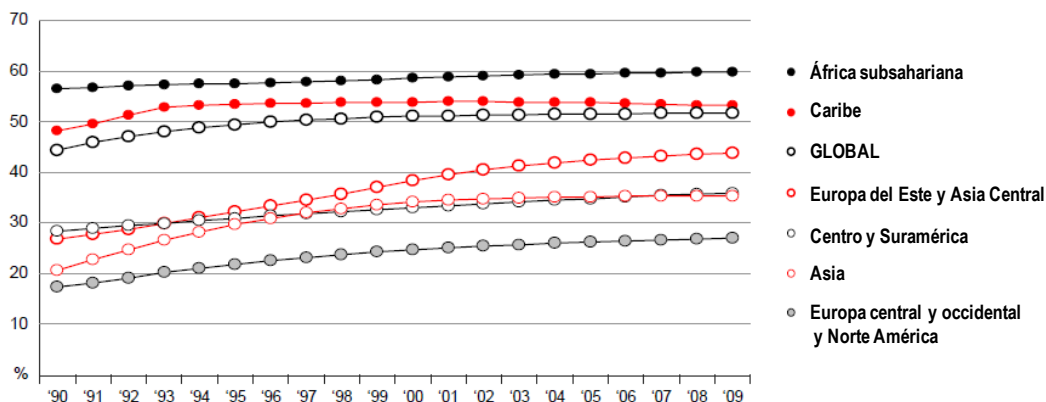


Figura 7. Evolución del VIH en la población femenina. Proporción de mujeres mayores de 15 años infectadas por el VIH en relación al total de la población, según la zona geográfica. Periodo 1990-2009. Fuente: ONUSIDA

El desarrollo de compuestos para su uso como microbicidas presenta una serie de desafíos, debido a que estos agentes deben ser no tóxicos, seguros y altamente eficaces, siendo además deseable que presenten actividad no sólo frente al VIH, sino también frente a otras enfermedades de transmisión sexual (ETS), como por ejemplo el herpes genital. Además su eficacia no debe verse afectada por factores como el plasma seminal o los cambios de pH que ocurren en la vagina durante el acto sexual^{86,93}. Debido a las diferentes rutas de transmisión del virus, sería conveniente el desarrollo de microbicidas que permitiesen frenar la transmisión viral vía vaginal y rectal. Estos desafíos han hecho que durante los últimos años numerosos candidatos a microbicida hayan fracasado en los diversos ensayos clínicos, haciendo necesario invertir más esfuerzos en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan cumplir los requisitos descritos y convertirse en microbicidas viables.

Hay distintos tipos de microbicidas según su modo de acción (Fig. 8). Los microbicidas pueden realizar su actividad en pasos diferentes dentro del ciclo viral, previniendo en última instancia la infección por el VIH. Cuando el virus se une a la membrana de la célula diana, se produce la fusión de las membranas y la entrada del virus, que es capaz de retrotranscribir su material genético en ADN que se integrará en el genoma de la célula huésped. A partir de aquí se producirá la transcripción del genoma viral y su traducción aprovechando la maquinaria celular, lo que en última instancia permitirá el ensamblaje y formación de nuevas partículas virales infectivas que saldrán de la célula pudiendo infectar a otras células, propagando así la infección por el VIH. En este sentido, se han formulado y ensayado diversos compuestos antivirales inhibidores de la entrada del virus en la célula, de la fusión

de la membrana viral y celular, y antivirales inhibidores de la retrotranscriptasa, la integrasa o la proteasa como agentes microbicidas⁹⁴⁻⁹⁹.

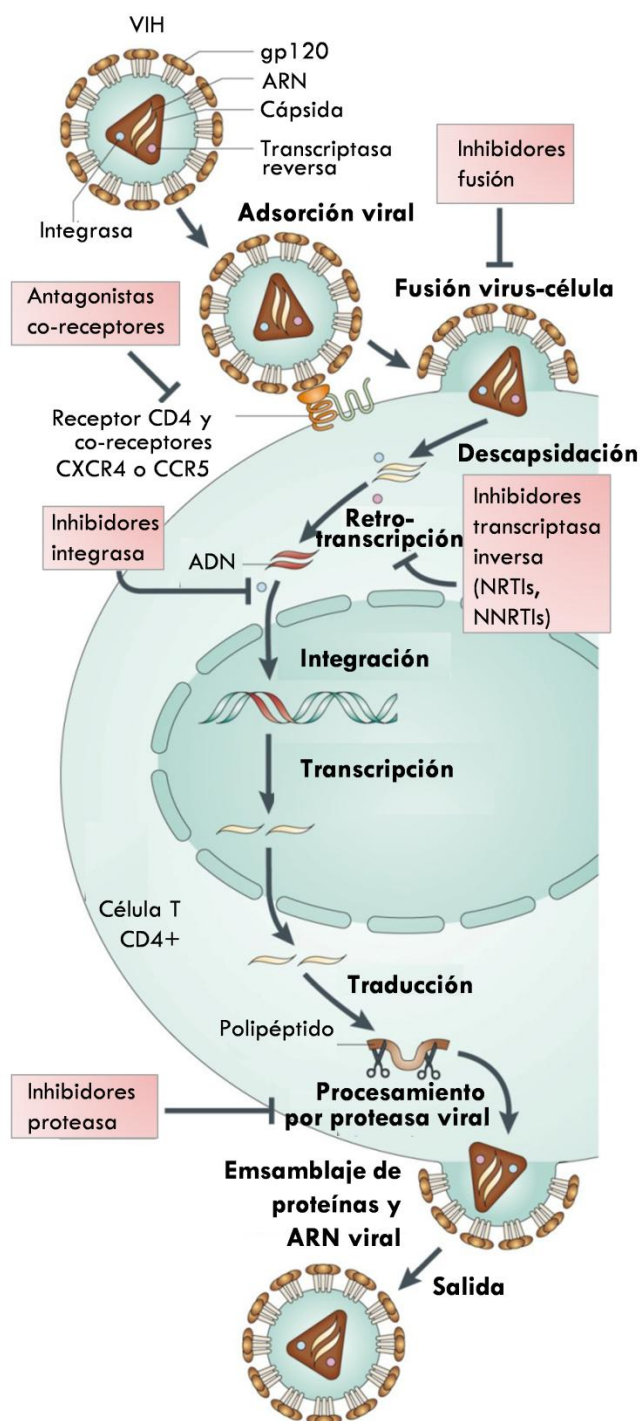


Figura 8. Ciclo del VIH-1 y dianas de acción de los distintos antirretrovirales (ARV). Los ARV pueden actuar en distintos puntos en el ciclo replicativo del VIH. Los inhibidores de la entrada pueden bloquear moléculas implicadas en el reconocimiento virus-células o impedir la fusión de los mismos. Otro tipo de compuestos denominados inhibidores de la transcriptasa inversa son capaces de impedir la retrotranscripción del ARN viral a ADN. Según su naturaleza, estas moléculas pueden ser análogos (NRTI) o no análogos de nucleósidos (NNRTI). Algunos ARV actúan a nivel de la integración del ADN proviral en el genoma de la célula diana (inhibidores de la integrasa) o impidiendo el procesamiento proteolítico de las proteínas del VIH y el adecuado ensamblaje de las partículas virales (inhibidores de la proteasa). Adaptado de De Clerq, E., 2007

La aparición y desarrollo de microbicidas se inició hace más de 20 años⁹⁰. Los primeros candidatos fueron agentes de tipo inespecífico como compuestos surfactantes no iónicos o moléculas polianiónicas, capaces de inactivar el virus o impedir su paso a través de las mucosas^{86,97,100-105}. Un ejemplo de posible microbicida fue el surfactante nonoxinol 9 (N-9), compuesto que se comercializó como espermicida, por su capacidad de lisar la membrana de los espermatozoides. El N-9 mostró alta eficacia *in vitro* frente al VIH y otros patógenos causantes de ETS, debido a su acción virucida al

romper la envuelta viral¹⁰⁶. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados con el N-9 en cuatro países (tres países subsaharianos y Tailandia), mostraron que la incidencia de infección por el VIH era superior en el grupo tratado con N-9 respecto al grupo placebo (16% vs 12%) descartando el uso de este compuesto como microbicida frente al VIH^{107,108}. También se analizaron como microbicidas varios compuestos polianiónicos^{109,110}. La actividad anti-VIH de estos compuestos se asoció al establecimiento de interacciones electrostáticas entre las proteínas de la envuelta viral y los grupos funcionales aniónicos de los compuestos, lo que previene la unión del virus a la célula diana, indicando un papel inhibitorio de estos agentes a nivel de la entrada viral. Tres de estos compuestos polianiónicos, el carragenano (Carraguard), la celulosa sulfato y el PRO2000, fueron muy eficaces *in vitro* y en ensayos preclínicos, aunque ninguno de ellos mostró eficacia en los ensayos clínicos realizados en humanos^{94,103-105,111}. Incluso en algunos polianiones, como en el caso de la celulosa sulfato, se encontraron mayores tasas de infección por el VIH en la rama tratada del ensayo que en la rama placebo¹¹². Algunas justificaciones para explicar el fracaso de estos compuestos polianiónicos en impedir la infección por el VIH en mujeres fueron su menor potencia en relación con otros antivirales, una mala absorción a nivel de la mucosa, la inducción de inflamación a nivel local, una menor actividad en presencia del plasma seminal, un efecto poco duradero o un efecto reduciendo y ejerciendo cambios en la microflora vaginal, lo que facilitaría la infección inicial por el VIH.

Otros microbicidas son los basados en el uso de ARV^{25,113-115}. Estos compuestos son muy potentes frente al VIH, altamente específicos y además son seguros como ha demostrado su uso continuado en el tratamiento clínico de la infección por el VIH. Actualmente, hay 31 ARV aceptados por la FDA para su uso frente a la infección por el VIH. Así, varios inhibidores de la transcriptasa reversa análogos y no análogos de nucleósidos (NRTI y NNRTI), inhibidores de la integrasa o inhibidores de la proteasa, utilizados como tratamientos estándar frente al VIH, se están analizando como posibles candidatos a microbicidas¹¹⁶. Esta lista está liderada por ARV que actúan tras la entrada del VIH, como el TFV o la emtricitabina^{89,117}. Alguno de estos ARV ha superado con éxito las primeras fases de los ensayos clínicos para su uso como microbicida. El TFV, un ARV de tipo NRTI, formulado en gel al 1% redujo la infección por el VIH en un 39% en el ensayo clínico de Fase II “Centre for the AIDS Programme of Research in South Africa” (CAPRISA) 004 realizado en Sudáfrica en 889 mujeres^{117,118}. Además, se observó una asociación entre una mayor protección y una mayor adherencia al tratamiento y una reducción del 51% en la transmisión de otros patógenos como el herpes genital. Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos realizados han fracasado, siendo el mejor ejemplo el ensayo clínico “Vaginal and Oral Interventions to Control de Epidemic” (VOICE), un ensayo clínico a gran escala en el que se reclutaron más de 5.000 mujeres en Sudáfrica, Zimbawe y Uganda y en el que se comparaba la seguridad y eficacia de la PrPE vía oral y tópica en la prevención de la transmisión sexual del VIH¹¹⁹. En este ensayo, el uso diario de un gel con TFV al 1% no fue eficaz en la prevención de la infección por VIH, poniendo incluso en entredicho los resultados obtenidos en el ensayo clínico CAPRISA 004. Sin embargo, están en marcha o previstos para que se realicen otros ensayos con formulaciones distintas de TFV^{49,120} (Tabla 1). Uno de ellos es el ensayo clínico CAPRISA 008, continuación del CAPRISA 004, que tiene lugar en Sudáfrica y que se inició en 2012. Otro es el ensayo clínico FACTS 001, un ensayo a gran escala con 2.900 mujeres participantes, también en Sudáfrica, en el que se usa un gel con TFV 1% en el mismo régimen de aplicación que en el ensayo clínico CAPRISA 004 y que se inició en 2011, esperando obtener los primeros resultados en

el año 2014. Pero no todos los ensayos con TFV están basados en su uso como gel vaginal. El ensayo clínico MTN 017 es el primer estudio a nivel mundial en Fase clínica II que ensaya una formulación de este ARV para impedir la transmisión del VIH por vía rectal. Esto es de especial relevancia en los colectivos homosexuales, pues se ha demostrado un riesgo 20 veces mayor de infección por vía anal que por vía vaginal en el caso de que no se use protección. Esto se debe a la mayor fragilidad y menor espesor de la mucosa rectal en comparación con la mucosa vaginal¹²¹. En el ensayo clínico MTN 017, que comenzará a lo largo de este año, hay enrolados más de 180 hombres de cuatro países diferentes (Perú, Sudáfrica, Tailandia y EE.UU.).

Otros ARV como los inhibidores de la retrotranscriptasa UC781¹²², dapivirina¹²³, saquinavir¹²⁴ y rilpivirina¹²⁵, los inhibidores de la fusión grifitsina¹²⁶, sifurvitide¹²⁷, C52L y cianovirina^{128,129}, o los inhibidores del correceptor CCR5 CMPD167, PSC-RANTES y maraviroc (MVC)¹³⁰⁻¹³² también están siendo estudiados como potenciales microbicidas. Estudios realizados con MVC en macacos mostraron que este ARV puede proteger frente a la infección vaginal por SHIV (Virus Quimérico de la Inmunodeficiencia Humana-Simía) con una eficacia del 43%¹³³.

La dapivirina se ha formulado como anillo vaginal y hay dos ensayos clínicos Fase III, “A Study to Prevent Infection with a Ring for Extended Use” (ASPIRE) y “The ring study” (IPM 027), en marcha en África^{120,134,135}. En estos dos ensayos clínicos, ASPIRE (MTN 020) e IPM 027, se está estudiando la seguridad y eficacia del anillo vaginal con dapivirina en 3.500 y 1.650 mujeres, respectivamente, de distintos países del África subsahariana. Ambos ensayos comenzaron en el año 2012 y se prevé su finalización en 2015.

Otro objetivo es poner en marcha este año el ensayo clínico Fase I MTN 013/IPM 026, en el que se evaluará la eficacia de la combinación de dapivirina+MVC como microbicida en formato de anillo vaginal en la población estadounidense^{120,136}.

En la búsqueda de nuevos microbicidas, se están ensayando también compuestos naturales y sintéticos, inespecíficos y específicos. Dos compuestos polianiónicos de tipo inespecífico, VivaGel™ y dextrin sulfato, han mostrado resultados positivos en estudios *in vivo* y en ensayos clínicos de Fase I y II^{137,138}. Además, el VivaGel™ también ha sido efectivo en el tratamiento de la vaginosis bacteriana, asociada a la infección por el VIH, en un ensayo clínico Fase II, estando en marcha ya un ensayo de Fase III frente a esta patología.

Estudio	Fase	Localización	Participantes	Tratamiento	Estado/ fecha finalización
Abiertos (Open label)					
CAPRISA 008	Abierto	Sudáfrica	700 mujeres	TFV 1% en gel 12h antes/después de contacto sexual	Bajo revisión del MCC (South African Medicine Control Council)
Fase III (seguridad y eficacia)					
ASPIRE (MTN 020)	Fase III	Malawi, Sudáfrica, Uganda, Zambia, Zimbabue	3.476 mujeres	Anillo vaginal dapivirina 4 semanas	Pendiente / Q4 2014-Q1 2015
The Ring Study (IPM 027)	Fase III	Sudáfrica, Ruanda, Malawi	1.650 mujeres	Anillo vaginal dapivirina 4 semanas	Planeado / 2015
FACTS 001	Fase III	Sudáfrica	Mínimo de 2.200 mujeres	1% TFV en gel 12h antes/después de sexo	En reclutamiento / Q1-Q2 2014
Fase II, IIb (seguridad, adherencia, aceptabilidad y eficacia)					
MTN 017	Fase II	Perú, Sudáfrica, Tailandia, EE.UU.	186 hombres que tienen sexo con hombres	TFV 1% en gel vía rectal reformulado (menos glicerina)	En desarrollo / Q3-Q4 2014
VOICE (MTN 003)	Fase IIb	Sudáfrica, Uganda, Zimbabue	5.029 mujeres	TDF/FTC oral diario TDF oral diario y TFV1% en gel	Reclutamiento completado / El brazo del TFV1% en gel fue parado debido a la falta de eficacia
FACTS 002	Fase II	Sudáfrica	60 mujeres jóvenes (16-17 años)	TFV 1% en gel	En desarrollo / Fecha no estimada
Fase I/II (seguridad, adherencia, aceptabilidad y viabilidad)					
IPM 015	Fase I/II	Kenia, Malawi, Sudáfrica, Tanzania	280 mujeres	Anillo vaginal dapivirina 4 semanas	Análisis de datos
IPM 014A	Fase I/II	Kenia, Malawi, Sudáfrica, Ruanda	280 mujeres	Dapivirina en gel vaginal diario	Análisis de datos
IPM 014B	Fase I/II	Sudáfrica	100 mujeres	Dapivirina en gel vaginal diario	Análisis de datos
IPM 020	Fase I/II	EE.UU.	128 mujeres	Dapivirina en gel vaginal diario	Análisis de datos
Fase I (seguridad, adherencia, aceptabilidad y viabilidad)					
MTN 014	Fase I	Sudáfrica, EE.UU.	28 mujeres	TFV 1% en gel vía vaginal y rectal reformulado (menos glicerina)	En desarrollo / Q1 2014
MTN 011	Fase I	EE.UU.	48 parejas heterosexuales	TFV 1% en gel vía vaginal	En desarrollo / Q2-Q3 2013
MTN 013/IPM 026	Fase I	EE.UU.	48 mujeres	Anillo vaginal dapivirina, anillo vaginal MVC, anillo vaginal dapivirina+MVC durante 28 días	En reclutamiento / Q1-Q2 2013
CONRAD 114	Fase I	EE.UU., República Dominicana	72 mujeres	TFV 1% gel vaginal	En desarrollo / 2013

Tabla 1. Principales ensayos clínicos para el estudio de microbicidas frente al VIH en diferentes fases de desarrollo actualmente en marcha a lo largo del mundo. <http://www.avac.org/>

Además, estudios *in vitro* con compuestos derivados de la 1,3,5-triazina funcionalizados con aminoácidos aromáticos¹³⁹ o el ácido lignosulfónico¹⁴⁰, un metabolito polimérico de la lignina procedente de las plantas, han mostrado una eficaz actividad antiviral a nivel de la entrada viral interaccionando con la gp120 de la envuelta del VIH. Por otra parte, el derivado WDO-217 de la fenil-tiadiazolildeamina ha sido capaz de inactivar al virus eliminando el zinc de las estructuras en dedo de zinc de las proteínas de la cápside viral, modificando sus propiedades¹⁴¹. Otros compuestos, como los derivados de la saliciliden-acilhidrazida, han mostrado actividad, no sólo frente al VIH inhibiéndolo en un paso postintegración, sino también frente a otros patógenos como *Chlamydia* o *Neisseria gonorrhoeae*¹⁴². Finalmente, se ha demostrado como algunos nuevos compuestos anti VIH presentan una acción dual, como es el caso de las pirimidendionas, capaces de actuar a nivel de la entrada y de la retrotranscriptasa¹⁴³.

Al igual que ocurre con la TARGA, en la que las combinaciones de distintos ARV son más efectivas en el control de la infección por el VIH que la monoterapia o biterapia, en el caso de los microbicidas también se ha demostrado que la combinación de distintas familias de compuestos puede presentar una actividad antiviral más potente que los compuestos individuales “per se”¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Esto supone una nueva perspectiva a la hora de diseñar y desarrollar nuevos microbicidas, especialmente mediante la combinación de agentes que actúen a distintos niveles del ciclo viral. Esto se puede traducir en efectos sinérgicos o aditivos entre los compuestos que potencien su actividad. Estas combinaciones podrían ser útiles a la hora de combatir la transmisión de aislados virales multirresistentes o múltiples patógenos de forma simultánea. Además, debido a su potencial efecto sinérgico, se podrían disminuir las dosis en las formulaciones de los distintos compuestos, lo que repercutiría, no solo en unos menores efectos secundarios asociados, sino también, en unos menores costes de producción. Esto es crucial cuando se pretende que los principales usuarios de estos productos sean los individuos de países en vías de desarrollo en los que el riesgo de infección por el VIH y la prevalencia del SIDA son más altos.

Algunas aproximaciones en el diseño de microbicidas con formulaciones combinadas ya han sido mencionadas^{147,148}, como por ejemplo el estudio MTN 013/ IPM 026. En otro ensayo clínico, el “HIV Prevention Trials Network” (HPTN) 069, el objetivo es analizar la eficacia de las combinaciones de MVC+emtricitabina y MVC+TFV como potenciales microbicidas¹²⁰. También se están estudiando combinaciones de MVC y TFV con otras moléculas como inhibidores de CD4, CXCR4 (AMD3100 o CADA)^{149,150} o con agentes de unión a carbohidratos (carbohydrate-binding agent (CBA)) tales como la grifitsina^{146,151,152}. Los estudios *in vitro* llevados a cabo con la combinación de TFV y aciclovir han mostrado resultados excelentes inhibiendo de forma dual la transmisión del VIH y del virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2)¹⁵³.

Los resultados obtenidos en el ensayo clínico CAPRISA 004 abren la puerta al uso de estos compuestos como microbicidas siendo una herramienta útil y necesaria en la lucha contra el VIH. Sin embargo, la normativa reguladora y los periodos de seguimiento de los ensayos clínicos hacen pensar que aún es pronto para poder hablar de la llegada de estos compuestos al uso clínico habitual. En 2010 la inversión en investigación de microbicidas ascendió a 247 millones de dólares⁴⁹, y a pesar de suponer un incremento del 5% respecto del año anterior, aún está lejos de las cifras propuestas por los diferentes actores implicados (asociaciones y organizaciones, grupos de investigación, etc.) para conseguir una rápida traslación de los ensayos *in vitro* a estudios clínicos. Además, no debemos olvidar que el desarrollo de estos microbicidas solo es una estrategia más en la lucha contra la propagación de la enfermedad, pero su uso debe estar asociado a otras prácticas profilácticas, como el uso de preservativo o diafragma o la circuncisión para minimizar los riesgos de transmisión.

Nanotecnología y su aplicación frente al VIH

En los últimos años, la nanotecnología ha emergido con fuerza como una nueva disciplina capaz de ofrecer soluciones a las limitaciones que encontramos en el desarrollo de estrategias preventivas frente al VIH¹⁵⁴⁻¹⁵⁸ (Fig. 9). La nanotecnología es el área de estudio que comprende la síntesis y caracterización de compuestos de tamaño nanoscópico (1nm=10⁻⁹m) y ha permitido el desarrollo de diferentes herramientas y materiales como nanocristales, nanocápsulas, nanopartículas,

etc. con propiedades excepcionales y múltiples aplicaciones en distintas áreas del conocimiento, que van desde la catálisis de procesos industriales hasta su aplicación en biomedicina.

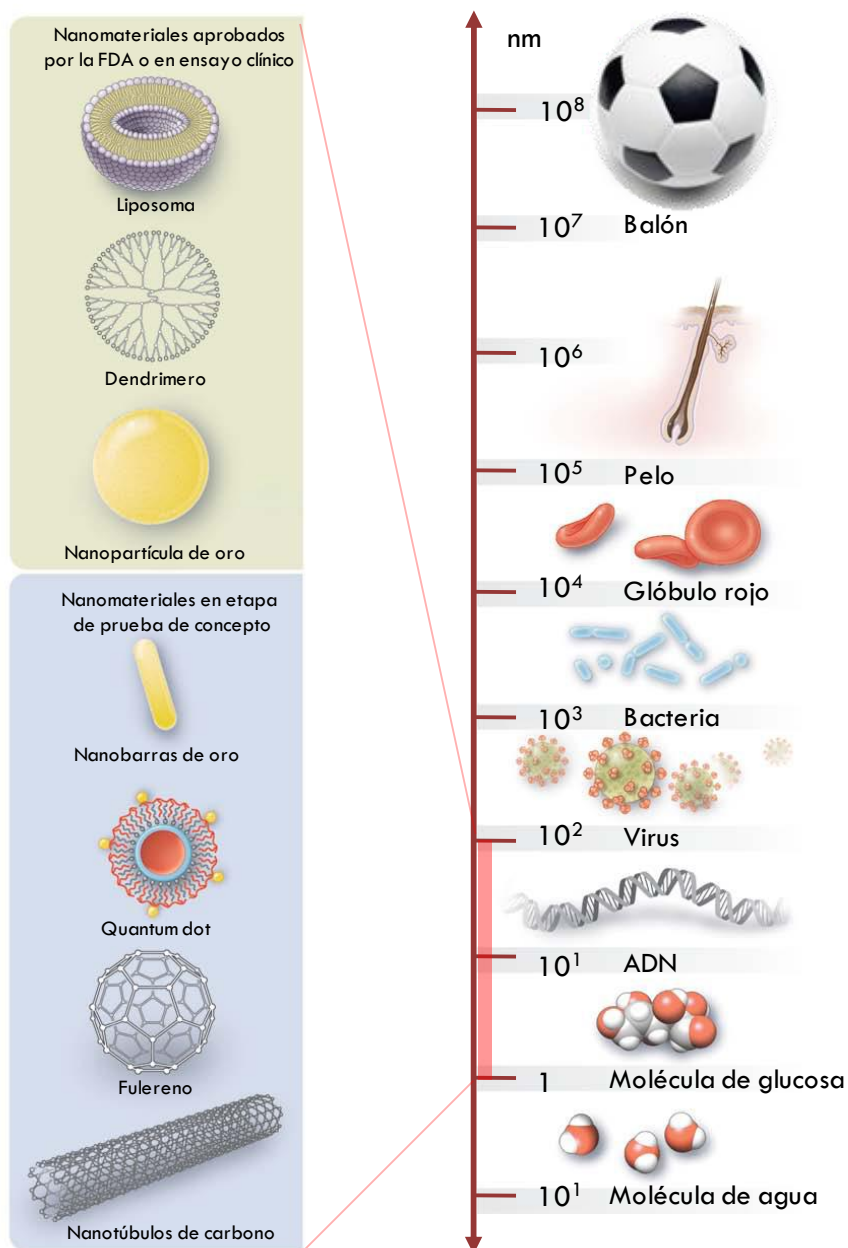


Figura 9. Nanomateriales usados en biomedicina. Algunos nanomateriales se están estudiando en ensayos clínicos, o han sido aprobados por la FDA para su uso en humanos, mientras que otros aún se encuentran en fase experimental. Entre ellos hay: liposomas, formados por moléculas con grupos hidrofílicos e hidrofóbicos capaces de autoensamblarse en medio acuoso; dendrímeros, nanopartículas hiperramificadas funcionalizadas en su superficie; nanopartículas de oro usadas para el transporte de fármacos, proteínas o oligonucleótidos; quantum dots, nanoestructuras semiconductoras capaces de confinar el movimiento de los electrones usadas en imagen clínica; o nanoestructuras derivadas del carbono como el fullereno. Fuente: Kim, BY. 2010

En el caso de su aplicación biomédica, estos nanomateriales han permitido la aparición de novedosas drogas o compuestos con ventajas farmacológicas útiles en la terapia y el diagnóstico de

distintas patologías como el cáncer o enfermedades infecciosas, entre las que destaca el VIH^{154,156,157,159}.

La nanotecnología ha generado una batería de compuestos “nano” con unas características fisicoquímicas únicas que determinan su especial funcionalidad. Una de estas características clave es su pequeño tamaño. Esto permite un diseño racional de los nanocompuestos que definirá sus capacidades para atravesar diferentes barreras biológicas, sus formas de excreción o sus mecanismos de internalización dentro de las células. Además, en general, tienen una gran relación superficie/volumen, lo que unido a su multifuncionalidad o a las características químicas de su superficie, puede tener importantes implicaciones a la hora de incrementar la solubilidad de compuestos o actuar como eficaces vectores para el transporte y liberación de moléculas. En general, estos nanomateriales suelen ser estructuras estables, permitiendo la encapsulación de distintos compuestos en su interior, y en algunos casos pueden mimetizar las propiedades de ciertas moléculas con actividad biológica teniendo una actividad intrínseca.

Distintos nanomateriales se han empleado a través de diversas estrategias para el tratamiento o la prevención del VIH. Así por ejemplo, la nanotecnología ha servido para mejorar las características farmacológicas de algunos ARV, para el desarrollo de vectores que permitan el transporte y liberación controlada de ARV o ácidos nucleicos o para el descubrimiento de nuevos agentes antivirales, algunos de ellos capaces incluso de alcanzar los reservorios virales¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Concretamente, nanocomplejos con el ARV indinavir se utilizaron con gran éxito en macacos para dirigir la liberación de este fármaco en tejido linfóide^{160,161}. También se han creado micelas poliméricas para encapsular efavirenz (EFV) y aumentar su solubilidad^{162,163}, nanocápsulas poliméricas que permiten la liberación dirigida del AZT directamente en el citoplasma celular^{164,165} o nanopartículas lipídicas con briostatina (un activador de los linfocitos CD4+) y nelfinavir capaces de activar al virus latente e inhibir la propagación viral¹⁶⁶. La aplicación más avanzada de la nanotecnología en la inmunoterapia frente al VIH es un parche dérmico conocido como DermaVir^{167,168}. Este dispositivo libera unas nanopartículas basadas en la conjugación de manosa polietilenamina (PEIm)¹⁶⁹, glucosa y un plásmido de ADN que codifica para antígenos virales. Estas nanopartículas pueden ser captadas por las CD a nivel de la dermis, las cuales, tras migrar a los ganglios linfáticos y estimular a linfocitos T son capaces de desencadenar una respuesta específica. Esta terapia experimental se encuentra en ensayo clínico Fase II.

Sin embargo, a pesar de todas sus ventajas y aplicaciones, algunas de estas nanopartículas también presentan una serie de limitaciones que dificultan su traslación a fases clínicas. Algunas de ellas son su toxicidad, la aparición de interacciones biológicas no deseadas, su bioacumulación, su degradación por enzimas celulares y extracelulares, su penetrancia y absorción en los distintos tejidos o su alto coste de producción, lo que supone un problema para su fabricación a gran escala¹⁵⁴.

Dendrimeros

Durante los últimos años, a través de la nanotecnología se ha generado una nueva familia de compuestos, denominados dendrimeros, que han mostrado su potencial como agentes terapéuticos o como transportadores de diferentes moléculas¹⁷⁰⁻¹⁷³ (Fig. 10). Los dendrimeros (dendri=árbol, -mer=ramificación) son macromoléculas de tamaño nanométrico caracterizadas por su alta ramificación y por su tamaño definido y estructura tridimensional. A diferencia de los polímeros, altamente heterogéneos debido a una síntesis de difícil control, los dendrimeros son partículas monodispersas, que forman estructuras esféricas altamente empaquetadas. La estructura de estos materiales tiene un alto impacto en sus propiedades físicas y químicas.

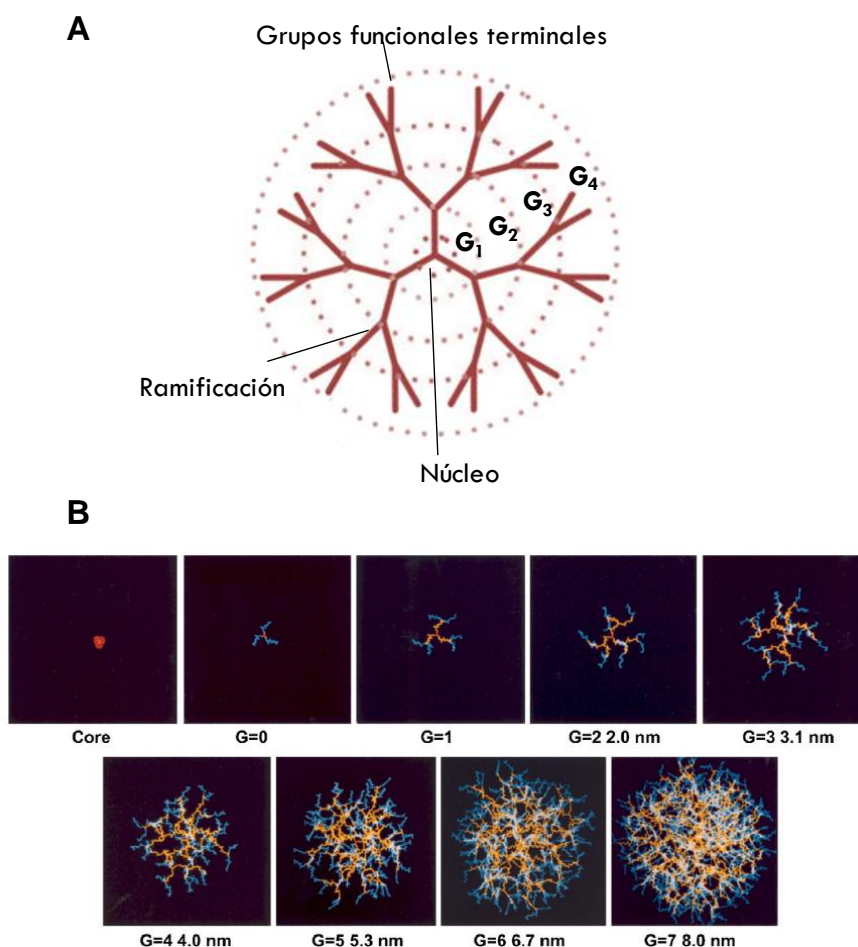


Figura 10. Esquema de la estructura típica de un dendrimer: **(A)** Las distintas generaciones de un dendrimer vienen determinadas por su progresivo mayor nivel de ramificación. **(B)** Representación gráfica de dendrimeros tipo PAMAM desde su núcleo inicial (core) hasta la generación G=7. Se aprecia como el incremento lineal en su diámetro se correlaciona con un crecimiento exponencial en el número de sus grupos funcionales periféricos. Fuente: Svenson S., 2012

La síntesis controlada de los dendrimeros permite el ensamblaje de estructuras simples en forma de ramificaciones a partir de un núcleo central iniciador, pudiendo dar lugar a diferentes generaciones de dendrimeros en función de sus “capas”. El tipo de núcleo y de ramificaciones puede ser diseñado para generar una gran variedad de dendrimeros con distinta forma y tamaño. Además,

las ramas del dendrímero pueden estar funcionalizadas con distintos grupos químicos que determinan sus propiedades biológicas y farmacológicas. Como resultado de su comportamiento único, se han empleado en una amplia variedad de aplicaciones industriales y biomédicas y se han convertido en una herramienta única para la síntesis de nuevos agentes antivirales. Además, y a diferencia de otras moléculas más pequeñas, debido a su estructura hiperramificada pueden interactuar con sus dianas de manera multivalente, constituyendo una de sus características principales.

Debido a su naturaleza química existen distintos tipos de dendrímeros. Entre los más comunes se encuentran los derivados de poliamidoaminas (PAMAM), los derivados de poli(propileniminas) (PPI) o los de estructura carbosilano¹⁷⁰.

Algunos dendrímeros han mostrado propiedades antimicrobianas^{174,175} y capacidad para prevenir la transmisión sexual del VIH en modelos animales de macaco¹⁷⁶ (Fig. 11). En este sentido, se han evaluado diferentes dendrímeros polianiónicos para su posible uso como microbicidas¹⁷⁷. Los resultados más positivos hasta el momento se han obtenido con el dendrímero SPL7013, comercializado como VivaGel™ por la compañía australiana Starpharma Inc, mencionado anteriormente. Se trata de un dendrímero polianiónico, funcionalizado con 32 grupos naftalensulfonato, con una alta actividad inhibitoria frente al VIH-1 y el VHS-2^{178,179}. El VivaGel™ ha sido el primer compuesto de naturaleza dendrímica enviado a la FDA para su aceptación como nueva droga. A pesar de que el ensayo Fase I evaluando su actividad antiviral reveló irritación moderada tras su uso vaginal continuado^{138,180}, actualmente se encuentra en un ensayo clínico Fase III en el tratamiento de la vaginosis bacteriana, como se ha comentado previamente.

Otros dendrímeros con distintos grupos funcionales en su periferia han mostrado también en diferentes ensayos *in vitro* su efectividad como microbicidas anti-VIH. Este es el caso de dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano^{182,183}; o de dendrímeros aniónicos con núcleos de benzilhidrilamida, ramificaciones de lisina y funcionalizados con ácido naftalendisulfónico o grupos derivados del ácido 3,5-disulfobenzoico, que han mostrado una gran actividad contra la infección por VIH-1 y el VHS-2^{177,178}, evitando la entrada viral y la fusión de membranas entre la envuelta viral y la célula diana. Dendrímeros policationicos de tipo “viológeno” también han mostrado *in vitro* actividad anti-VIH a través de su interacción con el correceptor CXCR4^{175,184}. Por otra parte, otros compuestos dendríméricos presentan una acción dual, como el dendrímero PAMAM de 4ª generación con grupos naftalendisulfónico SPL2923¹⁷⁷ o el dendrímero polisulfonado BRI2923¹¹⁰, que son capaces, no sólo de inhibir la entrada viral, sino también algunos pasos posteriores del ciclo replicativo del virus como la retrotranscripción o la integración. Otros dendrímeros multivalentes conteniendo azúcares expresados en la superficie de células del sistema inmunológico como globotriosa o glicosfingolípidos asociados a 3'sialilactosa pueden inhibir la infección del VIH-1 bloqueando la entrada viral¹⁸⁵. Los glicodendrímeros han demostrado su potencial también previniendo la transmisión del VIH vía DC-SIGN en CD en estudios *in vitro*¹⁸⁶.

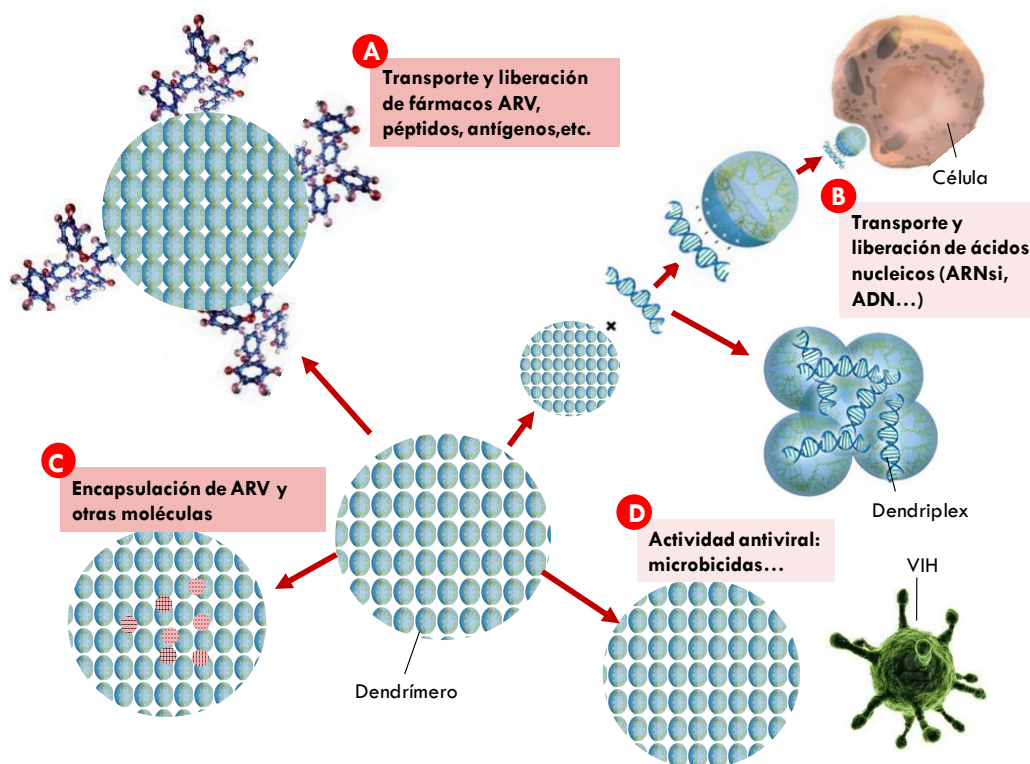


Figura 11. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros en el tratamiento y prevención del VIH. Debido a su multivalencia y a sus grupos funcionales de la superficie se han empleado como transportadores para la liberación controlada y dirigida de distintas moléculas biológicas (péptidos, oligonucleótidos) o fármacos. Además, algunos presentan actividad anti-VIH por sí mismos, siendo excelentes candidatos en el diseño de nuevas terapias antivirales y microbicidas. Fuente: Imágenes adaptadas de Jensen, L., 2011 ¹⁸¹

Sin embargo, los dendrímeros no sólo se han empleado como agentes antivirales, sino que también se ha aprovechado su multivalencia para su uso como transportadores de distintas moléculas en el tratamiento del VIH¹⁸⁷⁻¹⁹¹. Así, dendrímeros de tipo PPI funcionalizados con tuftsin (un tetrapéptido formado por Thr-Lys-Pro-Arg) o manosa se han estudiado para la liberación dirigida en macrófagos de distintos ARV como el efavirenz^{192,193}. Dendrímeros PPI maltosilados y conjugados con ácido siálico se han empleado también para el transporte de zidovudina¹⁹⁴. Otros dendrímeros funcionalizados con aminas se han analizado en terapia génica como vehículos de ácidos nucleicos¹⁹⁵. Es el caso de los dendrímeros tipo “Sic”, que se han utilizado satisfactoriamente en la transfección de oligonucleótidos antisentido capaces de bloquear la traducción de transcritos virales, inhibiendo la infección¹⁹⁶.

En esta Memoria se estudia la capacidad de tres familias de dendrímeros para su uso en diferentes estrategias contra el VIH.

Una de estas familias son los glicodendrímeros de 4^o generación con estructura de tipo PPI decorados con maltosas en su superficie y funcionalizados con grupos catiónicos¹⁹⁷. Los dendrímeros con azúcares en su periferia presentan una serie de ventajas, ya que estas moléculas aumentan su biocompatibilidad y además permiten su interacción con lectinas y otras moléculas en la superficie de las células del sistema inmune. Varios glicodendrímeros se han utilizado con éxito como agentes

antivirales o como agentes para el transporte de moléculas cargadas como péptidos, o ácidos nucleicos^{186,195,198,199}.

La segunda familia de dendrímeros está compuesta por dendrímeros catiónicos derivados del fósforo²⁰⁰. La presencia de átomos de fósforo en los puntos de ramificación de estas estructuras es particularmente importante debido a la versatilidad que ello ofrece en el diseño de estos compuestos, así como en las propiedades de los mismos^{201,202}. Los fosforodendrímeros han mostrado potencial como agentes transfectantes en terapia génica^{188,203-205}, en el tratamiento de procesos inflamatorios en modelos *in vivo* experimentales de artritis reumatoide^{206,207}, y los fosforodendrímeros de tipo “viológeno” han mostrado propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales¹⁷⁵.

Uno de los objetivos de esta Memoria ha sido investigar las características de estos glico y fosforodendrímeros como transportadores de péptidos inmunogénicos derivados del VIH y su posible papel en inmunoterapias basadas en CD.

La tercera y última familia de dendrímeros está formada por nanoestructuras de tipo carbosilano. Estos dendrímeros tienen un esqueleto basado en el carbono y el silicio y se diferencian del resto de grupos de dendrímeros en la gran apolaridad de su núcleo central y en la alta movilidad de las ramas dendríticas, lo que los convierte en excelentes candidatos para su aplicación biomédica. Los dendrímeros carbosilanos se han utilizado previamente como transportadores de oligonucleótidos y ARN antisentido en terapia génica para la inhibición del VIH, como en el caso del polication 2G-NN16, o como terapia frente al cáncer, enfermedades priónicas o el Alzheimer^{174,196,208-214}. Este tipo de compuestos también han demostrado su capacidad antiviral y antimicrobiana y su potencial uso como microbicidas^{182,215,216}. A lo largo de esta Memoria se ha evaluado la seguridad, mecanismo de acción y actividad anti-VIH de dos nuevos dendrímeros polianiónicos con estructura carbosilano, así como su capacidad como nuevos agentes microbicidas.

OBJETIVOS

2



OBJETIVOS

A pesar de su descubrimiento hace ya más de 20 años y de los nuevos tratamientos antirretrovirales, la infección por el VIH sigue siendo una enfermedad incurable. La aparición reciente de nuevas áreas del conocimiento, como la *nanotecnología*, ofrece a la comunidad científica herramientas novedosas para la búsqueda y desarrollo de nuevas terapias y estrategias encaminadas al tratamiento y prevención de esta enfermedad.

El principal objetivo de esta Memoria ha sido evaluar la utilización de nanopartículas de tipo dendrimérico en diferentes aproximaciones terapéuticas orientadas a la prevención y tratamiento de la infección por el VIH.

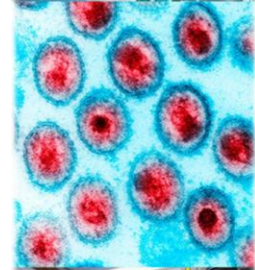
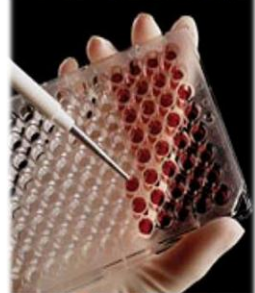
En concreto, los objetivos de esta Memoria son:

-Estudiar, *in vitro* y *ex vivo*, dos grupos de dendrímeros catiónicos: i-glicodendrímeros y ii-dendrímeros derivados de fósforo, como agentes transportadores para la carga y liberación de péptidos antigénicos, analizar su bioseguridad y estudiar su potencial aplicabilidad, de forma directa o como adyuvantes, en inmunoterapias basadas en el uso de CD.

-Estudiar la actividad antiviral de dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano, así como de su mecanismo de acción y su potencial combinación con otros agentes, con el fin de determinar su potencial aplicación en el desarrollo de geles microbicidas de uso tópico para la prevención de la transmisión sexual del VIH.

MATERIAL Y MÉTODOS

3



MATERIALES Y MÉTODOS

Dendrimeros

i) Glicodendrimeros

Los glicodendrimeros de cuarta generación de tipo poli(propilenimina) (PPI) conjugados con maltosa OS-PPIg4 (Pm: 11.340g/mol; catiónico: 32+), DS-PPIg4 (Pm: 24.400g/mol, neutro), DS-PPIg4-3(NH₂) (Pm: 22.900g/mol; catiónico: 3+) y DS-PPIg4-6(NH₂) (Pm: 22.000g/mol; catiónico: 6+) (Fig. 12) se sintetizaron en el grupo del Dr. Dietmar Appelhans del Leibniz Institute of Polymer Research (Dresde, Alemania) siguiendo los procedimientos previamente publicados²¹⁷. Los lotes de estos dendrimeros se disolvieron en agua destilada y se generó un stock a una concentración final de 1mM. Las diluciones de trabajo (μM) se obtuvieron a partir del stock de dendrimeros diluyéndolos en tampón fosfato salino (PBS) (Lonza, Walkersville, EE.UU.).

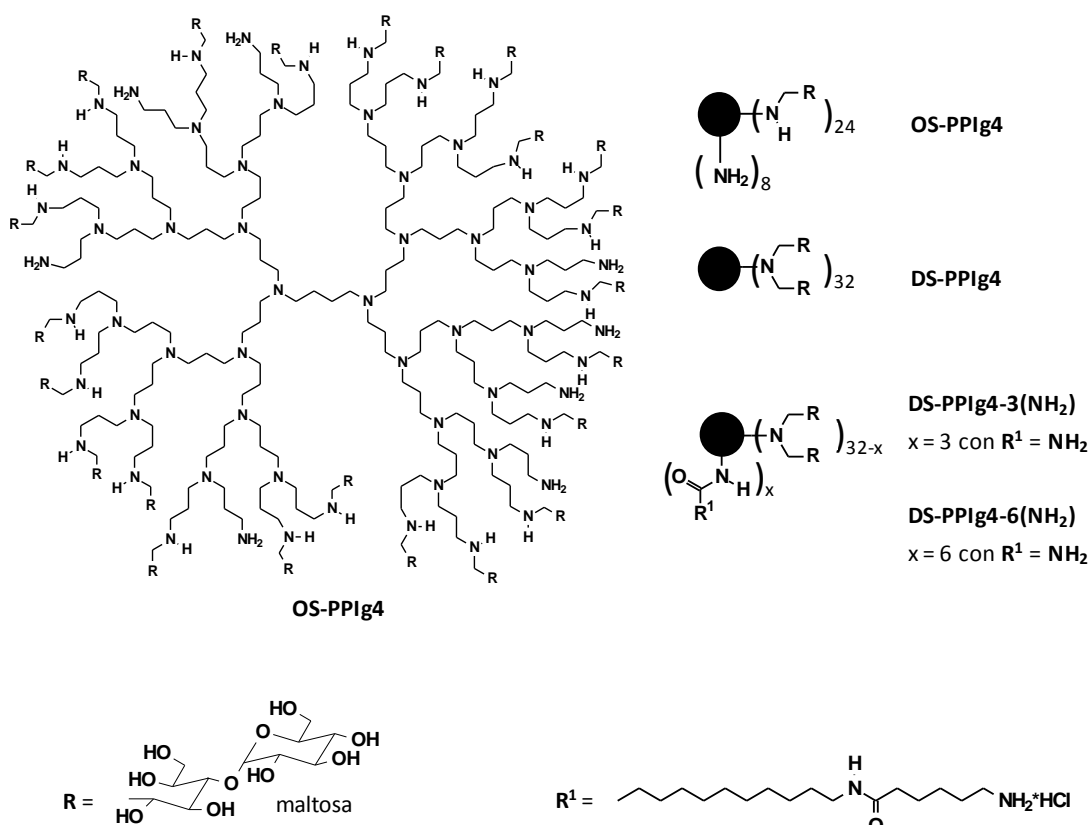


Figura 12. Estructura de los glicodendrimeros de estructura PPI decorados con maltosa.

ii) Fosfordendrimeros

Los dendrimeros policatiónicos derivados del fósforo de segunda generación G₂-NH⁺, tercera generación G₃-NH⁺ y el dendrimer de cuarta generación marcado fluorescentemente con julolidina G₄-NH⁺ se sintetizaron en el grupo del Dr. Jean Pierre Majoral del Laboratoire de chimie de coordination du CNRS (Toulouse, Francia) siguiendo los procedimientos previamente publicados²⁰² (Fig. 13).

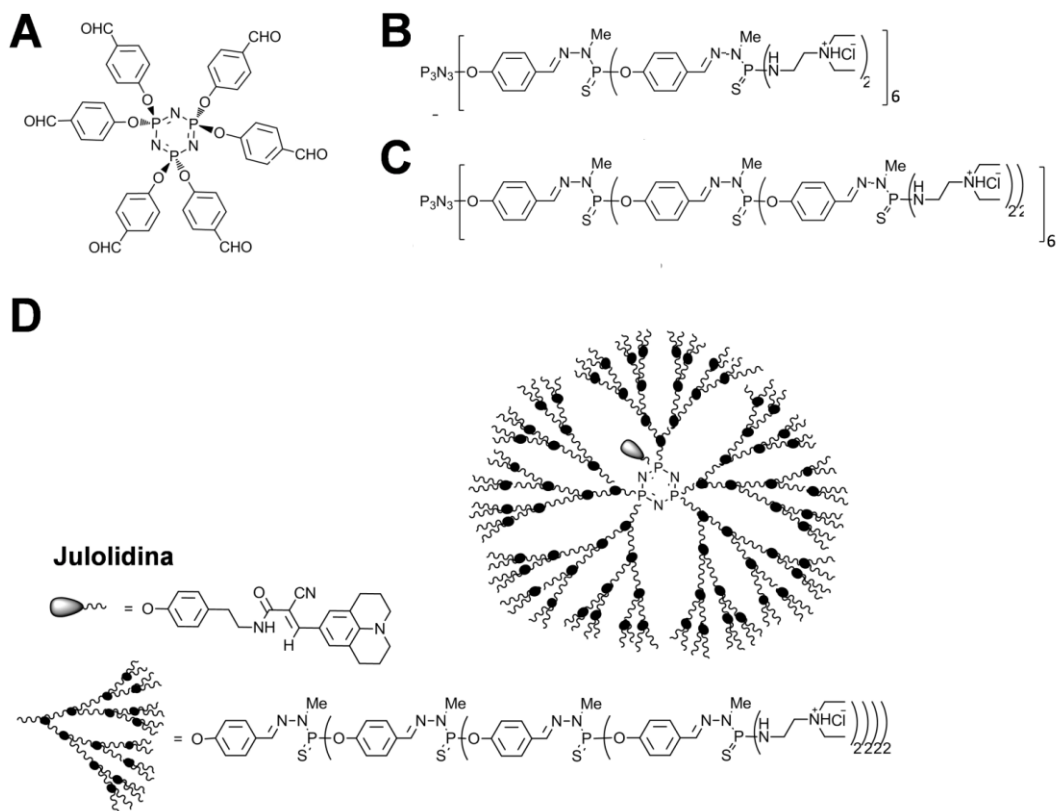


Figura 13. Estructura de los fosforodendrimeros. **(A)** Estructura del núcleo dendrítico derivado del fósforo G_0 . **(B)** Estructura del dendrímtero de segunda generación G_2-NH^+ (24 cargas positivas). **(C)** Estructura del dendrímtero derivado del fósforo de tercera generación G_3-NH^+ (48 cargas positivas). **(D)** Estructura del dendrímtero fluorescente julo- G_4-NH^+ con 80 grupos amonio terminales (80 cargas positivas).

iii) Dendrimeros carbosilanos

Los dendrimeros polianiónicos de tipo carbosilano con grupos terminales de tipo carboxilato: G_1-C_8 ($C_{72}H_{124}N_{16}Na_8O_{16}Si_5$; Pm: 1.794,20g/mol), G_2-C_{16} ($C_{160}H_{284}N_{32}Na_{16}O_{32}Si_{13}$; Pm: 3.901,11g/mol), G_3-C_{32} ($C_{336}H_{604}N_{64}Na_{32}O_{64}Si_{29}$; Pm: 8.114,93g/mol); con grupos terminales de tipo fosfonato: G_1-P_{16} ($C_{56}H_{108}N_{16}Na_{16}O_{24}P_8Si_5$; Pm: 2.145,6g/mol), G_2-P_{32} ($C_{128}H_{252}N_{32}Na_{24}O_{46}P_{16}Si_{13}$; Pm: 4.420,01g/mol), G_3-P_{64} ($C_{272}H_{540}N_{64}Na_{64}O_{96}P_{32}Si_{29}$; Pm: 9.520,55g/mol); con grupos terminales de tipo sulfato: G_1-S_4 ($C_{52}H_{101}N_{12}Na_4O_{16}S_4Si_5$; Pm: 1.509g/mol), G_2-S_8 ($C_{120}H_{236}N_{24}Na_8O_{32}S_8Si_{13}$; Pm: 3.332,85g/mol), G_3-S_{16} ($C_{256}H_{508}N_{48}Na_{16}O_{64}S_{16}Si_{29}$; Pm: 6.978,41g/mol); y con grupos terminales de tipo naftilsulfonato: G_1-NF_8 ($C_{84}H_{105}N_{12}Na_8O_{28}S_8Si_5$; Pm: 2.311,66g/mol) y G_2-NF_{16} ($C_{184}H_{244}N_{24}Na_{16}O_{56}S_{16}Si_{13}$; Pm: 4.934,02g/mol) (Fig. 14), fueron sintetizados siguiendo los métodos ya publicados por el grupo de Biodendrimeros de Aplicaciones Biomédicas del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá (UAH, Alcalá de Henares, Madrid, España). Al igual que en los casos anteriores, los lotes de estos dendrimeros se disolvieron en agua destilada y se filtraron antes de su utilización.

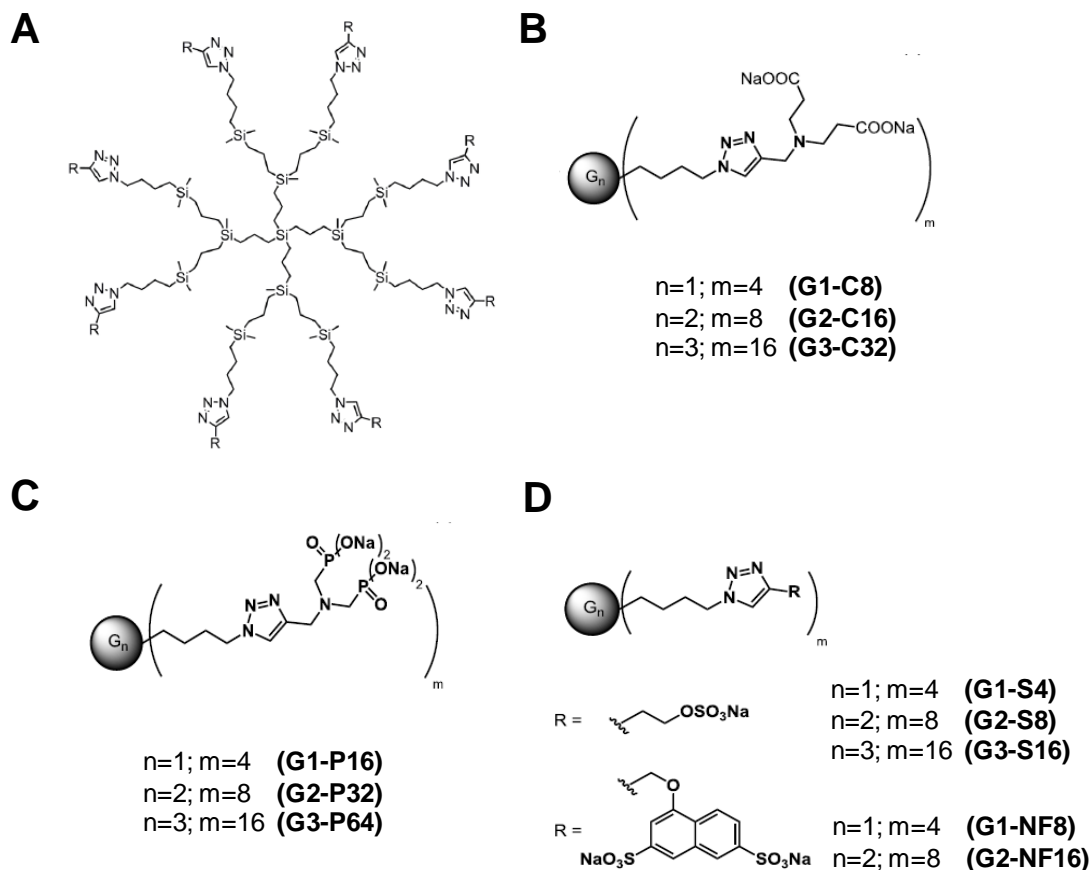


Figura 14. Estructura de los dendrímeros de tipo carbosilano. **(A)** Núcleo de la estructura de un dendrímero carbosilano de segunda generación. **(B)** Estructura de los dendrímeros polianiónicos con grupos carboxilato terminales. **(C)** Estructura de los dendrímeros carbosilanos aniónicos con grupos fosfonatos terminales. **(D)** Estructura de dendrímeros con grupos funcionales sulfato y naftilsulfonato. Ej. nomenclatura: *G1-NF8*, donde *G1* = generación 1, *NF* = tipo de grupo funcional, naftilsulfonato, 8 = número de cargas.

Cultivos celulares

i) Células primarias

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de buffy coats de donantes anónimos sanos procedentes de los centros de transfusiones de Madrid y Albacete siguiendo las recomendaciones de la normativa vigente (Real Decreto 1088/2005).

Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) fueron aisladas mediante un gradiente de Ficoll (Rafer, España) siguiendo los estándares del Biobanco VIH del HGU Gregorio Marañón (Madrid, España)²¹⁸. La sangre se diluyó en una proporción 1:1 con PBS y se procedió a su centrifugación en gradiente de densidad. Tras dicha centrifugación se recuperó el halo que contiene las CMSP y se procedió a varios ciclos de lavado-centrifugado con PBS (10min a 1500r.p.m.) para la limpieza y purificación de las mismas. Las CMSP resultantes se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Life technology, España) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 1% de L-glutamina y un cóctel de antibióticos (125mg/mL de ampicilina, 125mg/mL de cloxaciclina y 40mg/mL de gentamicina; Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EE.UU.). Las CMSP se cultivaron con 60UI/mL de interleuquina 2 (IL-2, Bachem, Suiza) y estimularon con 2μg/mL de

fitohematoaglutinina (PHA) (Remel, Santa Fe, EE.UU.) durante 72h en condiciones de cultivo (37°C en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa).

Las células dendríticas (CD) se derivaron a partir de monocitos CD14⁺ separados por selección positiva de una población inicial de CMSP utilizando anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolitas magnéticas MICRObeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Estos monocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos (2x10⁶/pocillo) en medio de cultivo RPMI 1640 completo suplementado con 50ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF; Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor), 20ng/mL de interleuquina 4 (IL-4, ImmunoTools, Friesoythe, Alemania) y 50nM de β-2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). Cada 2 días se realizaron cambios con medio fresco suplementado con GM-CSF e IL-4 para la correcta diferenciación de las CD. Las CD inmaduras (CDi) fueron maduras (CDm, células dendríticas maduras) añadiendo 20ng/mL de lipopolisacárido bacteriano (LPS, Sigma-Aldrich) durante 48h.

En cuanto a los linfocitos T CD4⁺, se obtuvieron también a partir de CMSP frescas mediante el uso de un kit de aislamiento basado en columnas y anticuerpos acoplados a bolitas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi Biotec). Estas células se cultivaron de igual modo que las CMSP.

ii) Líneas celulares

HEC-1A (Human Endometrial Carcinoma cells), una línea celular epitelial humana derivada de un adenocarcinoma de endometrio, se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC-LGC, Teddington, Reino Unido) y se cultivó en medio de cultivo McCoy's 5A modified medium (Biochrom AG, Alemania) suplementado con 10% de SFB, 2mM de L-glutamina y el cóctel de antibióticos.

VK2/E6E7 (ATCC), línea epitelial humana derivada de la mucosa vaginal, se cultivó en medio de cultivo Keratinocyte-Serum Free medium (Gibco) suplementado con factor de crecimiento epitelial humano recombinante (rEGF 0,1ng/mL, Invitrogen, Merelbeke, Bélgica), 0,05mg/mL de extracto de pituitaria bovina (Sigma-Aldrich) y 44,1mg/L de cloruro cálcico (concentración final 0,4mM).

HeLa P4.R5 MAGI (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID), línea celular que expresa de forma estable los correceptores CXCR4/CCR5 y que contiene el gen de la β-galactosidasa (β-gal) bajo el control de las regiones "Long Terminal Repeat" (LTR) del VIH-1, se cultivó en medio de cultivo DMEM (Life Technologies, España) suplementado con 5% SFB, 1% de L-glutamina, cóctel de antibióticos y puomicina (1μg/mL, Sigma-Aldrich).

HEK 293T (ATCC), línea celular empaquetadora derivada del epitelio renal, se cultivó en medio de cultivo DMEM suplementado con 5% SFB, 1% de L-glutamina y cóctel de antibióticos.

TZM.bl (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program), línea celular HeLa generada a partir de la línea JC53-bl, que expresa los marcadores CD4 y CCR5, y los genes de la luciferasa y β-galactosidasa bajo el control del promotor de VIH-1, se cultivó en medio de cultivo DMEM con 5% SFB, 1% de L-glutamina y un cóctel de antibióticos.

U87.CD4.CCR5 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program²¹⁹) es una línea celular humana derivada de glioblastoma transfectada con el plásmido pBABE-puro-CCR5 y seleccionada por

resistencia a puromicina. La expresión de los receptores CD4 y CCR5 está dirigida por los vectores MV7 y BABE MLV LTR, respectivamente. Las células U87.CD4.CCR5 se crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SFB, 1µg/mL de puromicina, 300µg/mL de geneticina, 1% de L-glutamina y el cóctel de antibióticos.

La línea celular linfoblástica Raji (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) y las células Raji-DC-SIGN, derivadas de las anteriores y que expresan altos niveles del marcador de superficie DC-SIGN, se cultivaron en medio RPMI completo suplementado con 5% de SFB. Estas mismas condiciones se emplearon para el crecimiento de la línea 8E5/LAV, línea T CD4- en la que cada clon contiene integrada una única copia de ADN proviral del VIH-1, dirigiendo la síntesis de partículas virales defectivas que no expresan retrotranscriptasa (RT), o para la propagación de las células Jurkat E6-1, línea T humana CD4+.

La línea Vero (ATCC), células epiteliales de riñón derivadas del mono *Cercopithecus aethiops* fueron crecidas en medio MEM completo (Lonza, Suiza) suplementado con 5% FBS.

Las células primarias y líneas celulares se cultivaron en placa de cultivo de 96, 24 ó 6 pocillos, a distintas concentraciones, según el tipo de experimento a realizar.

Aislados virales

Los aislados virales R5 trópicos VIH-1_{NL(AD8)} y VIH-1_{WT/BAL}, el aislado X4 VIH-1_{NL4.3}, y el VIH-1_{89.6} con tropismo dual (X4/R5) son aislados de laboratorio producidos por transfección transitoria de los plásmidos pNL(AD8), pWT/BAL, pNL4.3 y p89.6, respectivamente (todos ellos obtenidos del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID), en la línea celular 293T. Para ello, se aislaron y purificaron plásmidos conteniendo el genoma viral, crecidos en *E.coli* (Plasmid MaxiPrep, QIAGEN®). Se transfectaron placas de cultivo de células 293T con 15µg de plásmido/placa utilizando un método de transfección por cloruro cálcico. A las 24h se eliminó el medio y se lavaron los cultivos dos veces para retirar el plásmido no integrado en el genoma celular. Se añadió medio fresco al cultivo, recogiendo la producción viral presente en el sobrenadante del cultivo a las 24h. Los stocks virales se clarificaron por filtración (filtro de 0,45µm) y se llevó a cabo su titulación viral en la línea celular HeLa MAGI P4.R5. Para ello, se cultivaron 2x10⁵ células con medio de cultivo completo en placas de 24 pocillos y se añadieron 40µL de la preparación viral a distintas concentraciones, realizándose las diluciones correspondientes. Se pusieron las diluciones por triplicado y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 72h. Transcurrido este tiempo se trataron las células con β-Gal para determinar el número de células infectadas. Se procedió al conteo de las células azules con el fin de determinar el número de u.i (unidades infecciosas)/mL. También se tituló la producción viral cuantificando el antígeno VIH-p24^{gag} por ELISA (HIVp24^{gag} ELISA kit. INNOTEST™ HIV antigen mAB, Innogenetics®, Bélgica) y se estableció la relación de partículas infectivas por mL y µg de virus por mL.

Los aislados primarios de VIH-1 procedentes de pacientes, todos ellos de tropismo R5, R23 (clado A1), X-1936 (clado C), X2160-2 (clado G), X3016 (clado F1), P2392-3(CRF02_AG) y X-2457-2 (CRF47_BF) fueron donados por la Dra. Lucía Pérez (Unidad de Biología y Variabilidad del VIH. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid, España). Su

titulación también se realizó por ELISA de VIH-p24^{gag}. Los virus env-X4-luc y env-VSVG-luc, que contienen el fondo genético del VIH-1, pero la envuelta del VIH-1 X4 o del lentivirus VSVG, respectivamente, se produjeron por co-transfección transitoria del plásmido pNL4-3.Luc.R-E- (NIH) con los plásmidos pHXB2-env o pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA, EE.UU.) en células 293T. Estos virus contienen integrado en su genoma el gen de la luciferasa, enzima que se expresará en aquellas células infectadas en las que se integre el genoma viral.

En cuanto al aislado de VHS-2 333, éste fue cedido por la Dra. Line Reinert del Dpto. de Microbiología de la Universidad de Aarhus (Dinamarca).

Reactivos y antirretrovirales

Se sintetizaron tres péptidos derivados del VIH (Eurogentec, Sereing, Bélgica) que se marcaron con fluoresceína o con tetrametilrodamina (TAMRA). La estructura de estos péptidos fue la siguiente: i- un péptido derivado de la proteína Nef del VIH-HXB2 (172-191): NHGMDDPEREVLEWRFSRLAF-COOH (20 aminoácidos (aa) de longitud, carga (-3)); ii- un péptido derivado de la proteína Gag-P24 del VIH-HXB2 (71-80): NH-DTINEEAAEW-COOH (10 aa, carga (-4)) y iii- un péptido derivado de la proteína de la envuelta Gp160 del VIH-HXB2 (634-648): NH-EIDNYNTIYTLLEE- COOH (15 aa, carga (-4)). Aunque todos estos péptidos suponen únicamente una parte de la secuencia de la proteína, se utilizó el nombre completo de la proteína a la hora de nombrar a los mismos en los distintos experimentos: Nef, Gp160 y P24.

Como controles de inhibición de la replicación viral se han utilizado diferentes sustancias y antirretrovirales a lo largo de esta Memoria. Entre ellos están: AZT o zidovudina ($C_{10}H_{13}N_5O_4$; Pm: 267,242g/mol, Retrovir, GSK) inhibidor nucleósido de la RT; T-20 ($C_{202}H_{298}N_{50}O_{64}$; Pm: 4.492,1g/mol, Fuzeon, Genentech, San Francisco, Ca, EE.UU.) inhibidor de la fusión; Maraviroc (MVC, $C_{29}H_{41}N_5F_2O$; Pm: 513,666g/mol, Selzentry, Pfizer) inhibidor de la entrada al bloquear al correceptor CCR5 ; Efavirenz (EFV, $C_{14}H_9N_1O_2Cl_1F_3$; Pm: 315,675g/mol, Merck) inhibidor de la RT no análogo de nucleósido; Tenofovir disoproxil fumarato (TDF, $C_9H_{14}N_5O_4P$; Pm: 287,213g/mol, Viread, Gilead) inhibidor nucleósido de la RT; Atazanavir ($C_{38}H_{52}N_6O_7$; Pm: 802,942, Reyataz, Bristol Myers), inhibidor de la proteasa; Raltegravir ($C_{20}H_{21}F_1N_6O_5$; Pm: 444,42g/mol, Isentress, Merck & co.), inhibidor de la integrasa viral; AMD3100 ($C_{28}H_{54}N_8$; Pm: 502,782g/mol, Sigma-Aldrich) antagonista del correceptor CXCR4; TAK-779 ($C_{33}H_{39}N_2O_2$; Pm: 531,1g/mol) antagonista del correceptor CCR5; Dextran-sulfato (Pm >500.000, Sigma-Aldrich) como inhibidor del VIH debido a la presencia de grupos sulfato y Suramin (Sigma-Aldrich), molécula aniónica seleccionada como control positivo de inhibición de la adhesión.

Otros productos químicos utilizados también en experimentos a lo largo de esta Memoria han sido: Dextrano (Pm: $4,84 \times 10^5$ g/mol, Sigma-Aldrich), una molécula inerte que se utiliza como control negativo en los ensayos de toxicidad celular o el Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), usado como control de muerte en los ensayos de toxicidad. La colchicina (Sigma-Aldrich), un inhibidor de la polimerización de microtúbulos capaz de frenar el tráfico intracelular de vesículas, se utilizó como control en los experimentos de trans-infección célula-célula. La fitohematoaglutinina (PHA) se utilizó como control positivo de proliferación celular.

Preparación de complejos dendrímeros-péptido

El término dendriplex se utiliza para hacer referencia al complejo formado por la asociación entre un dendrímero y los péptidos. Para la formación de los distintos dendriplexes se empleó una concentración final de péptido de $1\mu\text{M}$. En el caso del dendrímero OS-PPIg4, todos los experimentos se realizaron con una concentración de $1\mu\text{M}$ del dendrímero y una concentración de $1\mu\text{M}$ del péptido P24 (equivalente a un ratio carga:carga péptido/dendrímero de 1:8). Se utilizaron concentraciones de $1\mu\text{M}$ de DS-PPIg4, $5,33\mu\text{M}$ de DS-PPIg4-3(NH₂) y $2,66\mu\text{M}$ de DS-PPIg4-6(NH₂) en los experimentos (equivalentes a un ratio molar 1:1 para el dendrímero neutro y a ratios de carga 1:4 y 1:4, respectivamente). Con los fosfordendrímeros, se utilizaron ratios dendrímero:péptido de 8:1 y 10:1 para el G₂-NH⁺ (correspondiente a concentraciones de $1,33\mu\text{M}$ y $1,67\mu\text{M}$, respectivamente). Se utilizaron ratios carga:carga dendrímero:péptido de 12:1 y 20:1 (correspondiente a concentraciones de dendrímero de $0,5\mu\text{M}$ y $1\mu\text{M}$) y 4:1 y 6:1 (correspondiente a concentraciones de $0,2\mu\text{M}$ y $0,3\mu\text{M}$) para el dendrímero G₃-NH⁺ y julo-G₄-NH⁺, respectivamente.

Antes de tratar a las células con los dendriplexes, éstos se formaron mezclando los péptidos y los dendrímeros en medio RPMI 1640 a las concentraciones adecuadas, en función de los ratios carga:carga deseados, e incubándolos durante 30min a 37°C.

Medidas de fluorescencia polarizada

Las muestras se prepararon incubando los péptidos marcados fluorescentemente con distintas concentraciones de los dendrímeros en PBS. Los cambios en la fluorescencia polarizada se midieron utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50B (Reino Unido). La polarización se monitorizó a 532nm con una excitación de 497nm para los péptidos P24 y Nef y a 575nm con una excitación de 554nm para el péptido Gp160. La polarización se expresó como:

$$P = \frac{I_V - GI_H}{I_V + GI_H}$$

Donde I_V e I_H son las intensidades de emisión horizontal y vertical de la luz polarizada, respectivamente, cuando se utilizó luz polarizada verticalmente para excitar la muestra. El factor G (medido experimentalmente) tiene en cuenta los efectos debidos al instrumento de medida y se puede expresar como:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Donde I_{HV} e I_{HH} son las intensidades de emisión de la polarización vertical y horizontal, respectivamente, cuando se utiliza luz polarizada horizontalmente para excitar la muestra. La polarización de cada muestra procede de la media de tres medidas de I_V e I_H .

Electroforesis de complejos dendrímero-péptido

Los complejos entre dendrímeros y péptidos derivados del VIH se formaron en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) con un tiempo de incubación de 10min a 22-25°C. Se estudió su formación evaluando el retardo en la migración electroforética de los péptidos fluoresceinados en un gel de agarosa al 7% a 90V durante 35min. Para la visualización del gel se empleó un equipo Biorad Molecular Imager Gel Doc XR System (Hercules, CA, EE.UU.).

Ensayos de toxicidad celular

Se utilizaron los ensayos de MTT y MTS para evaluar la toxicidad de los dendrímeros en los diferentes tipos celulares. Ambos ensayos miden la citotoxicidad en relación a la actividad mitocondrial celular.

i. Ensayo MTT

Esta técnica es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células vivas para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio en cristales insolubles de formazán. Ello permite determinar el efecto letal de los compuestos en estudio, en este caso los dendrímeros, sobre el metabolismo celular. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.). Brevemente, tras el tiempo de incubación de las distintas poblaciones celulares con las diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (1×10^5 células/pocillo), se retiró el sobrenadante que contenía el dendrímero y se sustituyó por 200µL de Opti-MEM® (medio sin suero ni rojo fenol), añadiendo también 20µL/pocillo de MTT (Azul de Tiazolil, 5mg/mL, concentración final en pocillo de 0,5mg MTT/mL). Tras 4h de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la centrifugación de la placa a 2000r.p.m. 10min y a la retirada del sobrenadante con el exceso de MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán se disolvieron en 200µL de DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). La placa se agitó a 700r.p.m. para asegurar la correcta disolución de los cristales y la concentración de formazán se determinó por espectrofotometría utilizando un lector de placas (Multilector de placas Synergy 4, Biotek Instrument, EE.UU.) a una longitud de onda de 570nm (referencia de 690nm). El espectrofotómetro se calibró a 0 utilizando Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calculó en base a la fórmula: $[A] \text{ test} / [A] \text{ control} \times 100$. Se utilizó dextrano como control negativo de muerte celular, debido a su efecto inocuo, mientras que el DMSO al 10% se utilizó como control positivo. Cada experimento se realizó por triplicado.

ii. Ensayo MTS

Al igual que el ensayo MTT, esta técnica (CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega®, Madison, WI, EE.UU.) se utilizó para evaluar el efecto de los dendrímeros sobre el metabolismo celular, medido a partir de cambios en la actividad mitocondrial.

El MTS es un método colorimétrico basado en la reducción del compuesto (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, en un proceso acoplado al reactivo PMS (Fenacina metosulfato), a unos cristales de formazán que son solubles en el medio de cultivo. La absorbancia del formazán puede ser medida directamente en la placa de cultivo a 490nm

sin ningún proceso adicional. La conversión del MTS en formazán soluble en medio acuoso se realiza por enzimas deshidrogenasas del metabolismo celular, de manera que la cantidad de formazán medido es un reflejo directamente proporcional del número de células viables en el cultivo.

El ensayo MTS se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, tras el tiempo de incubación de las distintas poblaciones celulares con las diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (1×10^5 células/pocillo), se retiró el sobrenadante del cultivo y se sustituyó por 100 μ L de medio más 20 μ L de la mezcla de reactivos MTS/PMS. Tras 4h de incubación en condiciones de cultivo, se procedió directamente a la lectura de la placa en el espectrofotómetro a 490nm. Dextrano y DMSO se utilizaron también como controles negativos y positivos de muerte celular, respectivamente.

Internalización y fagocitosis de los complejos dendrímero-péptido por las células dendríticas

Para analizar la captura usamos péptidos fluorescentes. Las CD, CDi o CDm ($2,5 \times 10^6$ células en placas de 24 pocillos) se incubaron con los dendrímeros, los péptidos o los dendriplexes durante 2 y 24h a 37°C. Tras este tiempo, se realizó un lavado ácido de las células con PBS-glicina, pH 3,2, para eliminar el péptido no internalizado adherido a la superficie celular, seguido de varios lavados con PBS. Tras los lavados, se marcaron y analizaron las células por citometría de flujo (Gallios, Beckman Coulter Inc, CA, EE.UU.). El porcentaje de células positivas conteniendo el péptido fluorescente así como la IFM (Intensidad de Fluorescencia Media) de cada una de las muestras se analizó con el software FlowJo (Tree Star Inc, Oregon, EE.UU.). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

Estudio del fenotipo de las células dendríticas

Se realizó un estudio por citometría de flujo de la expresión de determinados marcadores de superficie en CD tratadas con los dendrímeros, los péptidos o los dendriplexes para determinar su fenotipo y estado de maduración. Los anticuerpos utilizados para el marcaje fueron: anticuerpos marcados con FITC: anti-CD80 (Beckman Coulter); anticuerpos marcados en PE: anti-CD1a (Beckman Coulter) y anti-CCR7 (Miltenyi Biotec, Alemania); anticuerpos marcados en ECD: anti HLA-DR (Beckman Coulter); anticuerpos marcados en PC5: anti CD83 (Beckman Coulter) y anti-CD86 (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, EE.UU.); anticuerpos marcados en PC7: anti-CD14 (Beckman Coulter).

Ensayos de migración de células dendríticas

Se realizó un ensayo de quimiotaxis para evaluar la migración *in vitro* de CDm. Para ello, se añadieron 10^5 CD cargadas con los péptidos, los dendrímeros o los dendriplexes en la cámara superior de un sistema de transwell de 24 pocillos (4,5mm de tamaño de poro) (Corning Costar, Cambridge, MA, EE.UU.) que contenían en su cámara inferior medio solo o conteniendo las quimioquinas CCL19 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EE.UU) o CCL21 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.), ambas a una concentración de 250ng/mL. Las placas se incubaron durante 3h a 37°C. Tras este tiempo, se recogió 600 μ L de medio de la cámara inferior del transwell y se determinó el número

de células que habían migrado mediante su conteo por citometría de flujo. Se contó el número de eventos a lo largo de 60s. Cada experimento se realizó por triplicado.

Estimulación alogénica de linfocitos T por parte de células dendríticas

Se purificaron células T naïve procedentes de CMSP por selección negativa utilizando un kit para aislamiento de células T naïve CD4⁺ (Miltenyi Biotec). Las células T naïve CD4⁺ se trataron con CFSE 5 μ M (CellTrace CFSE cell proliferation kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) durante 10min a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante. Se co-cultivaron 10.000 CD tratadas o no con los dendrímeros, los péptidos o los dendriplexes con 5x10⁴ células T alogénicas marcadas con CFSE en placas de 96 pocillos de fondo plano. A día 7, se analizó la pérdida de señal de CFSE como consecuencia de la proliferación celular por citometría de flujo. Cada experimento se realizó por triplicado.

Estimulación autóloga de linfocitos T específicos frente al VIH por parte de las células dendríticas tratadas con los dendriplexes

Se emplearon CMSP de pacientes asintomáticos, controladores de élite, infectados por el VIH-1 con cargas virales ≤ 10.000 copias de ARN viral/mL y concentraciones de linfocitos T CD4⁺ ≥ 450 cél/mm³ (Fig. 15).

Se aislaron los monocitos mediante el método de adherencia al plástico, obteniéndose por otra parte una mezcla celular enriquecida en células T. Estos linfocitos se lavaron, se resuspendieron en medio X-VIVO 10 (Lonza, Maryland, EE.UU) libre de suero y se marcaron con CFSE. Las CD autólogas derivadas de monocitos se incubaron con los dendrímeros, péptidos o dendriplexes, lavaron y co-cultivaron con los linfocitos autólogos marcados con CFSE (4x10⁴ CD/2x10⁵ linfocitos T/pocillo) en un volumen final de 0,2mL de medio X-VIVO 10 suplementado con 1 μ M de AZT para impedir la posible replicación del VIH endógeno. Se utilizaron linfocitos solos o co-cultivados con CD sin tratar como controles de proliferación. Los co-cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron a 37°C durante 6-7 días. Tras este tiempo, se analizó la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (CD3⁺CD8⁻) y CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) por marcaje celular con los anticuerpos anti-CD3-Per-CP y anti-CD8-PE (BD Biosciences) y análisis por citometría (FACSCalibur, BD Biosciences).

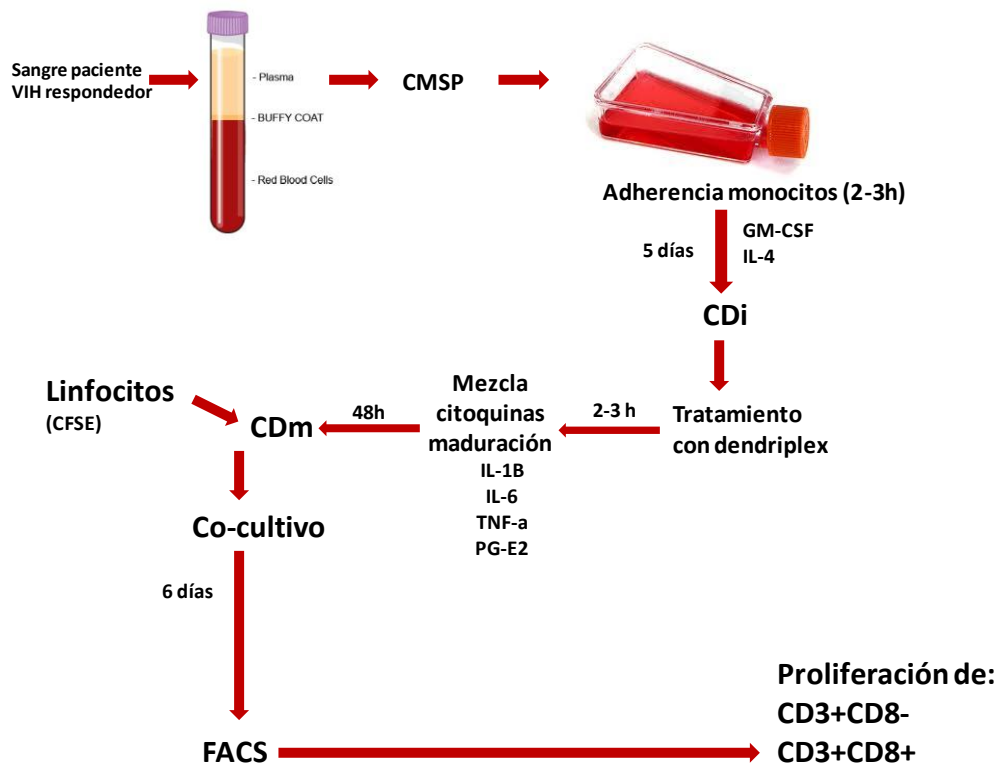


Figura 15. Protocolo de co-cultivo autólogo para la estimulación de células T mediante el uso de CD tratadas con los dendrímeros, péptidos o dendriplexes.

Además se realizó un experimento similar con células de sangre de individuos sanos no VIH, pero en el que además se realizaron diferentes rondas de co-cultivo entre CD y linfocitos T autólogos con el objetivo de seleccionar la población de linfocitos capaces de reconocer específicamente a los péptidos ensayados y determinar una expansión clonal de los mismos. Las CD pulsadas con una mezcla de los 3 péptidos: P24, gp160 y Nef se co-cultivaron con células T CD4⁺ autólogas. A la semana siguiente, CD frescas se incubaron de nuevo con la misma mezcla de péptidos y se co-cultivaron con las células T autólogas de la ronda anterior. Este proceso se realizó en 4 rondas sucesivas. Finalmente, las CD frescas se trataron con la mezcla de péptidos, los dendrímeros o los dendriplexes y se co-cultivaron con las células T CD4⁺ autólogas, las cuales se marcaron previamente con CFSE. A los 7 días se estimó la proliferación de las células T mediante citometría de flujo.

Experimentos de inhibición del VIH

i). Inhibición de la internalización en células epiteliales

Se cultivaron células epiteliales humanas de las líneas HEC-1A o VK2/E6E7 (5×10^4 /200μL) en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron a 37°C durante toda la noche para su adhesión. Al día siguiente, tras 1h de pretratamiento con distintas concentraciones de cada uno de los dendrímeros, las células se infectaron 3h con 50ng/10⁶células de los aislados virales R5 VIH-1_{WT/BAL} o X4 VIH-1_{NL4.3}. Tras este tiempo, se lavaron las células (se incluyó un lavado ácido con glicina, pH=3,2 para eliminar el virus adherido a la superficie pero no internalizado) y se lisaron añadiendo Tritón X-100 0,1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EE.UU.) (45min de incubación a 37°C). Se cuantificó la

cantidad de VIH Ag p24^{gag} en el lisado utilizando un kit de ELISA p24^{gag}. Cada experimento se realizó por triplicado.

ii). Inhibición de la adhesión (binding) e internalización del VIH en CMSP

Las CMSP activadas se plaquearon en placas de 96 pocillos de fondo redondo (2×10^5 /200 μ L) en medio RPMI completo. Tras 1h de pretratamiento con las distintas concentraciones establecidas para cada uno de los dendrímeros, las células se infectaron durante 3h con los aislados virales X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} e incubaron a 4°C ó 37°C, según se realizase el ensayo de “binding” o de internalización, respectivamente. Posteriormente, se lavaron las células varias veces. En los ensayos de internalización, se realizó también un lavado ácido con PBS-glicina, pH 3,2, para eliminar todas las partículas virales adheridas a la superficie celular, pero no internalizadas. Posteriormente, las células se lisaron con 0,1% Tritón X-100. Se cuantificó la producción de VIH Ag p24^{gag} por ELISA. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

iii). Inhibición de la replicación del VIH

Las CMSP activadas se plaquearon a razón de 2×10^5 cél/200 μ L en placas de 96 pocillos de fondo redondo, se trataron con distintas concentraciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 durante 1h, y se infectaron 3h con 50ng de distintos aislados virales VIH/10⁶ CMSP. Posteriormente se lavaron y se pusieron en condiciones de cultivo. Tras 72h, se recogió el sobrenadante del cultivo de las CMSP infectadas y se cuantificó la concentración de VIH Ag p24^{gag} por ELISA. En el caso de la línea celular U87.CD4.CCR5, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos (5×10^4 cél/200 μ L) y se trataron con los distintos dendrímeros. Posteriormente, las U87.CD4.CCR5 se infectaron 3h con 5ng de los aislados virales R5 VIH-1_{NL(AD8)}, VIH-1_{WT/BAL} o el aislado viral VIH-1_{89.6} con tropismo dual. Tras 72h de cultivo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se cuantificó la producción de VIH Ag p24^{gag} por ELISA.

Este tipo de ensayos se realizó también con las líneas celulares TZM.bl o HeLa MAGI P4.R5. Las células se plaquearon toda la noche para que se adhirieran a la placa a una concentración de 15×10^3 /200 μ L y posteriormente se trataron 1h con los distintos compuestos. Tras el pretratamiento, se infectaron 3h con 20ng de VIH-1. Tras 72h de infección, se lisaron las células y se cuantificó la replicación viral según los valores de expresión de la luciferasa, en el caso de las TZM.bl (Luciferase Assay System, Promega), o β -gal, en el caso de las HeLa MAGI (Galacto-Light Plus™ System, Applied Biosystems, CA, EE.UU), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

iv). Inactivación del VIH por los dendrímeros de tipo carbosilano

Se adhirieron 4ng de X4 VIH-1_{NL4.3} o de R5 VIH-1_{NL(AD8)} por centrifugación (3200 r.p.m., 1h) a una placa de 96 pocillos, previamente cubierta con poli-L-lisina (1h, 37°C). Tras el lavado de los pocillos para eliminar el VIH no unido a la placa, se trataron las partículas virales adheridas a la placa durante 1h con los distintos dendrímeros, con dextran-S o Triton X-100 (1%). Posteriormente, se lavaron las partículas virales para eliminar todo el dendrímero no unido a las mismas, y se pusieron en contacto con 2×10^5 CMSP previamente activadas. Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de las CMSP a los 3 días post-infección, y se cuantificó la producción de VIH Ag p24^{gag} por ELISA. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

v). Ensayos de “tiempo de adición”

Las células TZM.bl se infectaron con X4 VIH-1_{NL4.3} y se trataron a diferentes tiempos en pre y post-infección (-1, 0, 1, 2...7h) con distintos compuestos antivirales que actúan en diferentes pasos del ciclo viral. Se cuantificó la infección celular tras 30h post-infección cuantificando los valores de expresión de la luciferasa.

vi). Ensayo de fusión celular

La línea celular derivada de células T 8E5/LAV, que contiene una copia defectiva del ADN proviral integrada en su genoma y que expresa las proteínas del VIH a excepción de la RT, se cultivó 48h con las células HeLa MAGI CD4+ en un ratio 1:1 (3×10^4 cel/pocillo) en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 para determinar si éstos interferían entre la unión de la proteína viral gp120 y el receptor celular CD4. Se utilizaron los antirretrovirales AZT y T-20 como controles del experimento. Las células 8E5 expresan gp120 viral en su membrana, por lo que pueden interaccionar y fusionarse con células que expresen CD4 en su superficie, como las células HeLa MAGI. Tras la fusión de membranas, la proteína viral Tat de las células 8E5 podría activar la expresión del gen reportero de la β -galactosidasa en las células HeLa MAGI. Esta actividad β -gal se cuantificó por quimioluminiscencia utilizando el kit Galacto-Light Plus™ System (Applied Biosystems, CA, EE.UU). El porcentaje de fusión de membranas entre las células 8E5-HeLa MAGI se calculó respecto al control positivo de células no tratadas.

vii). Ensayo de ELISA gp120 VIH/CD4

Se utilizó un kit de captura por ELISA de gp120 (ImmunoDiagnostic, Inc. Woburn, EE.UU) para evaluar la actividad inhibitoria de los dendrímeros carbosilanos sobre la unión gp120-CD4. Para ello la proteína recombinante gp120 VIH-1_{IIIb} (100ng/mL) se preincubó o no durante 30min con distintas concentraciones de los dendrímeros y posteriormente se añadió sobre una placa cubierta con proteína CD4. La cantidad de gp120 capturada por el CD4 se detectó mediante un anticuerpo anti-gp120 murino conjugado con peroxidasa. Se usó T-20, una molécula inhibidora de la fusión que se une a gp41, como control negativo del experimento.

viii). Inhibición de la transmisión de partículas virales libres y de células infectadas a través de una monocapa de células epiteliales

Para la obtención de una monocapa perfecta de células epiteliales polarizadas, las líneas celulares HEC-1A y VK2/E6E7 se cultivaron 7 días en un sistema de transwell sobre un soporte de policarbonato permeable de 0,4 μ m de poro (Costar, Cambridge, MA, EE.UU.) y se cambió el medio de cultivo cada 2-3 días. La formación de la monocapa se monitorizó con un voltímetro y un electrodo EVOM2STX2 (World Precision Instrument, Sarasota, EE.UU.), mediante la medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (Transepithelial Electrical Resistance, TEER, $\Omega \times \text{cm}^2$). Sólo son detectables valores altos de TEER en las células HEC-1A (valores de resistencia de la monocapa $>150 \Omega \times \text{cm}^2$), pero no en

el caso de las VK2/E6E7, debido a la ausencia de uniones intercelulares estrechas del tipo “tight-junctions” en esta línea celular.

Se monitorizó la TEER en la monocapa durante 1h (a intervalos de 10min) cuando las monocapas de células epiteliales se trataron con los dendrímeros y posteriormente se infectaron con 1µg de X4 VIH-1_{NL4.3} para evaluar el efecto protector de los dendrímeros sobre el paso de partículas virales a través de la misma. Además, las monocapas se pretrataron con los dendrímeros G3-S16, G2-NF16 o suramin durante 1h antes de añadir 100ng de X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} en la cámara superior del sistema de transwell. El sobrenadante de la cámara inferior se recogió a distintos tiempos post-infección y se cuantificó la cantidad de virus capaz de atravesar la monocapa en cada condición mediante la medida del VIH Ag p24^{gag} por ELISA. Cada experimento se realizó por triplicado.

Por otra parte, CMSP infectadas con R5 VIH-1_{NL(AD8)} (1x10⁵) se añadieron en la cámara superior del sistema de transwells sobre monocapas de células HEC-1A y VK2/E6E7 previamente tratadas con los dendrímeros. Posteriormente, se colocó el inserto sobre la cámara inferior, conteniendo 2x10⁵ CMSP activadas. Tras 24h de incubación, se retiró el inserto de la cámara superior y las células de la cámara inferior se mantuvieron durante 7 días en cultivo. La concentración de VIH Ag p24^{gag} fue cuantificado por ELISA en el sobrenadante de estas células. Las diferencias en la transmisión de las células infectadas se calcularon teniendo en cuenta las diferencias en la concentración de VIH Ag p24^{gag} respecto a la condición en la que la monocapa de células epiteliales no fue tratada. Cada experimento se realizó por triplicado.

Determinación de la interacción entre los dendrímeros y los receptores y correceptores de superficie en las células diana de la infección por el VIH

Se evaluó la capacidad de los dendrímeros de interaccionar con distintos marcadores de la superficie celular en las células susceptibles de infección por el VIH por citometría de flujo. Las CMSP activadas se trataron con los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 a una concentración de 5µM durante 15min a 4°C y posteriormente se marcaron con los anticuerpos: anti-CD4-PC7 (clon 13B8.2, Beckman Coulter, Fullerton, EE.UU.), anti-CXCR4-APC (clon 12G5, BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, EE.UU) o anti-CCR5-PE (clon 2D7, BD Biosciences). Los marcadores CD4, CXCR4 y CCR5 de la superficie celular se analizaron por citometría de flujo con el software FlowJo. Se evaluaron los ratios de Intensidad de Fluorescencia Media integrada (IFMi) de cada marcador de superficie en relación a la de las CMSP control no tratadas (IFMi = % de células positivas x IFM del marcador en cuestión). Los antagonistas de los correceptores CXCR4 y CCR5, AMD3100 y TAK-779, respectivamente, se utilizaron como controles positivos para el bloqueo de los mismos. Cada experimento se realizó por triplicado.

Transmisión célula-célula del VIH

La capacidad de los dendrímeros para impedir la transferencia de partículas virales desde células donadoras infectadas por el VIH a células diana se analizó co-cultivando las líneas celulares Raji, Raji-DC-SIGN o CD derivadas de monocitos con las células diana TzM.b1. Las células donadoras

(Raji o CD), tras ser infectadas 2h con los aislados virales X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} y lavadas varias veces para eliminar el virus no capturado por las mismas, se trataron 1h con los dendrímeros y se co-cultivaron 5h con las células TZM.bl. La trans-infección desde estas células donadoras a las células reporteras TZM.bl se cuantificó midiendo la expresión de luciferasa en las células TZM.bl. Además, se realizó en paralelo el mismo experimento pero tratando en este caso a las células diana TZM.bl y co-cultivándolas con células donadoras infectadas por el VIH y no tratadas. En estos ensayos se utilizaron colchicina y suramin como controles de la inhibición de la transmisión viral. Cada experimento se realizó por triplicado.

Estudio del efecto de los dendrímeros sobre la sinapsis infecciosa por microscopia confocal de fluorescencia

Se marcaron células de la línea linfóide Jurkat con CFSE (Cell Trace™ Violet Stain, Invitrogen) y se pegaron 2h a 37°C a razón de 3×10^5 cél/condición en cristales recubiertos de poli-L-lisina. Por otra parte, las CD maduras se incubaron 4h a 37°C con el aislado viral X4 VIH-1_{NL4.3} a una MOI (Multiplicidad de Infección) =1. Tras ser lavadas para eliminar el virus que no se había internalizado, las células se trataron con los distintos compuestos durante 1h a 37°C antes de llevar a cabo su adhesión durante 1,5h en los mismos cristales en los que se encontraban adheridas las células Jurkat. El ratio de co-cultivo de ambos tipos celulares fue de 3:1 (10^5 CD/condición). En paralelo, las células receptoras Jurkat también se trataron 1h con los dendrímeros y posteriormente se co-cultivaron con CD infectadas por el VIH pero no tratadas. Tras el co-cultivo, las células se fijaron con formaldehído 3%, se permeabilizaron con Tritón 0,1% y se marcaron. El marcador CD81 se tiñó con un anticuerpo primario de ratón anti-CD81 humano (BD Pharmingen). Un anticuerpo anti-ratón producido en burro y acoplado al fluoróforo cy5 se utilizó para el marcaje secundario (Jackson Immunoresearch). Finalmente, para el marcaje de las partículas virales, la proteína p24^{gag} del VIH se cuantificó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-VIH-1 p24^{gag} (KC57) acoplado a FITC (Coulter, CA, EE.UU.). Tras el marcaje, se cuantificó el número de sinapsis infecciosas en los co-cultivos. Una sinapsis infecciosa se definió como un conjugado CD-Jurkat donde la mayor parte del virus se encuentra polarizado hacia la zona de contacto entre ambos tipos celulares. La visualización de las muestras se realizó en un microscopio confocal de fluorescencia invertido (SP2; Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Las imágenes de las secciones obtenidas se analizaron y procesaron utilizando el software Image J (National Institute of Health, EE.UU.). Se contabilizaron los eventos de dos experimentos independientes.

Ensayos de proliferación

Las CMSP activadas y marcadas con CFSE se pretrataron con los dendrímeros a distintos tiempos (1, 4 ó 24h). Tras este pretratamiento, las CMSP activadas se lavaron y estimularon o no con PHA (Remel, Santa Fe, EE.UU.) a distintas concentraciones (0,25, 0,5, 1 ó 2µg/mL). La proliferación se determinó a los 5 días de cultivo por citometría de flujo en base a la pérdida de marcaje de CFSE. La condición PHA+IL-2 se utilizó como control positivo de proliferación. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Perfil de secreción de citoquinas Th1/Th2

Las células de las líneas HEC-1A y VK2/E6E7 se trataron 0,5, 1, 3, 5 y 24h con concentraciones de 5µM y 3µM, respectivamente, de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16. En cuanto a la evaluación del perfil de secreción de citoquinas en las CDi o CDm estimuladas con los péptidos, los dendrímeros o los dendriplexes, los sobrenadantes celulares se recolectaron tras 24h de tratamiento. Se cuantificó en estos sobrenadantes las concentraciones de 10 citoquinas (IFN-γ; IL-2; IL-10; IL-8; IL-6; IL-4; IL-17α; IL-1; TNF-α; IL-12p70) utilizando el kit DAPlex (Th1/Th2/Inflammation, GenProbe). Las concentraciones de citoquinas (pg/mL) se calcularon a partir de las correspondientes curvas patrón obtenidas con los estándares que proporciona el kit. Todas las muestras se analizaron por citometría de flujo. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Estudio del efecto de los dendrímeros en vaginas de ratones CD1(ICR)

Este estudio se realizó en las instalaciones del animalario del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) y en conformidad con las normas de manejo y cuidado animal del Comité de ética del mismo. Se emplearon hembras de ratones de la cepa CD1(ICR) de 6-8 semanas de edad (Harlan, España) que se mantuvieron en condiciones especiales libres de patógenos en el animalario del HGUGM. 20 ratonas en estro (seleccionadas mediante frotis vaginal) se trataron vaginalmente con 25µL de una suspensión de los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16 en PBS a las concentraciones de 5µM y 50µM. Como control se utilizaron ratones que recibieron 25µL de vehículo (PBS). Se estudiaron dos especímenes dentro de cada grupo experimental. A las 2 y 24h después del tratamiento, se extrajeron las vaginas y se fijaron con formaldehído al 10%. Las muestras fueron posteriormente embebidas en parafina, cortadas en secciones y teñidas con hematosilina-éosina para su estudio anatomo-histopatológico. Todas las secciones se examinaron por patólogos cualificados dentro de las instalaciones de Anapath S.L (Laboratorio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario, Granada, España).

Se utilizó el sistema de graduación certificado por la Norma ISO 10993-10 para el examen microscópico de la biocompatibilidad de compuestos en tejido vaginal con el fin de analizar el efecto de los dendrímeros sobre este tejido. Este sistema utiliza una escala de puntuación de 0 (normal o ausencia de efectos adversos) a 4 (efectos adversos graves) para evaluar distintos parámetros tales como la integridad del epitelio, congestión vascular epitelial, infiltración leucocitaria y edema. La puntuación obtenida de la media de la combinación de los distintos parámetros define el ratio de irritación vaginal. Valores entre 1-4 determinan un ratio de irritación vaginal “mínimo”, valores entre 5-8 se consideran ratios de irritación “medios”, valores de 9-11 definen una irritación “moderada” y finalmente puntuaciones de 12 a 16 determinan un grado de irritación vaginal “severo”. Los compuestos con valoraciones de irritación vaginal de entre 1 y 8 se consideran aceptables para su aplicación mediante esta vía.

Determinación de la actividad antimicrobiana de los dendrímeros

La actividad antimicrobiana de los dendrímeros frente a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 00603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28753 y

Candida albicans ATCC 10231 se evaluó utilizando el método de microdilución en caldo. Esta técnica se basa en la determinación del crecimiento de un microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de un determinado compuesto que se encuentra diluido en el medio de cultivo. En este caso, se prepararon distintas diluciones 1:2 de cada uno de los dendrímeros a partir de la concentración máxima no tóxica de cada uno de ellos. Estas diluciones se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la NCCLS/CLSI.

Evaluación de la acción de los dendrímeros sobre la movilidad espermática

El ensayo de supervivencia espermática es uno de los métodos de control de calidad más utilizados en los laboratorios de reproducción asistida. Además es accesible a la mayoría de los laboratorios de reproducción como método para la evaluación de toxicidad de los espermatozoides a diferentes elementos. En este caso se determinó si los dendrímeros tenían un efecto tóxico sobre ellos.

Muestras de semen de distintos individuos se capacitaron por “swim-up” para obtener la Recuperación de Espermatozoides Móviles (REM). Se añadieron alícuotas de cada una de estas muestras a tubos con 1mL de Sperm Prep fresco (Medicult, Dinamarca) hasta alcanzar una concentración final de espermatozoides móviles progresivos de 5×10^6 /mL. Se añadieron cantidades calculadas de cada dendrímero a cada tubo problema hasta alcanzar la concentración adecuada de compuesto en cada uno de ellos. Se analizó la toxicidad provocada o no por cada dendrímero y si ésta era dependiente de la concentración. Los espermatozoides no tratados con los dendrímeros se utilizaron como control. Cada condición se analizó por duplicado.

La movilidad progresiva espermática (%) y el índice de movilidad progresiva espermática (IMPE) se examinaron a las 24h por el sistema automatizado Sperm Class Analyzer v5.0 (Microptic, Barcelona, España). El índice de movilidad progresiva espermática evalúa el efecto sobre la supervivencia espermática debido al efecto del dendrímero. Índices de movilidad progresiva espermática $<0,75$ indicarían un efecto tóxico para el espermatozoide por parte del dendrímero analizado en la concentración estudiada.

Experimentos de inhibición del VHS-2

Las células Vero se pretrataron o no 1h con los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16 previamente a su infección con el VHS-2 (MOI = 0,1). 35h después de la infección se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se cuantificó la infección viral por titulación de los mismos. Para la titulación de los sobrenadantes, distintas diluciones de cada uno de ellos se utilizaron para la infección de células Vero durante 1h. Tras este tiempo, se eliminaron los sobrenadantes de los cultivos, y se añadió medio nuevo conteniendo 0,4% de inmunoglobulina humana para el bloqueo de las partículas virales no infectivas. A las 48h se procedió a la tinción de las placas virales con azul de metileno 0,03% y a su conteo, determinándose así la titulación viral para cada una de las muestras. Cada experimento se realizó por triplicado.

Ensayos de combinación

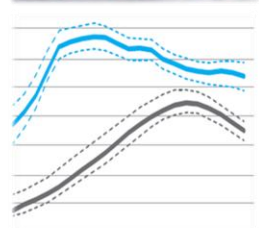
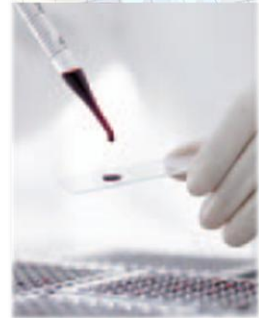
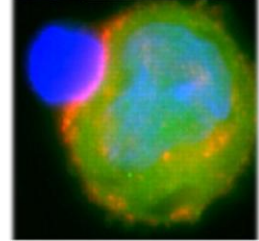
Este tipo de estudios se realizaron siguiendo la metodología previamente descrita para el estudio de la actividad antiviral de compuestos aislados o en combinación¹⁵⁰. Las células TzM.bl o CMSP se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos en estudio, o con sus combinaciones, 1h antes de su infección durante 3h con 20ng de X4 VIH-1_{NL4.3}, R5 VIH-1_{NL(AD8)} o X4/R5 VIH-1_{89.6}. A los tres días post-infección, la replicación viral se cuantificó midiendo la actividad luciferasa (en el caso de las TzM.bl) o mediante la cuantificación de la concentración del antígeno p24^{gag} en el sobrenadante del cultivo por ELISA. El análisis de la sinergia entre compuestos, así como el cálculo de las concentraciones efectivas 50, 75 y 90 (EC₅₀, EC₇₅ y EC₉₀, respectivamente) se realizó con el software CalcuSyn, basado en el teorema del Índice de Combinación (CI-Combination Index)-Isoblograma de Chou y Talalay²²⁰ que permite determinaciones cuantitativas de las interacciones químicas donde valores de CI entre 0,1 y 0,9 indican efecto sinérgico, entre 0,9 y 1,1 representan un efecto aditivo y >1,1 representan una ausencia de interacción positiva. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando los test no paramétricos de la U de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis, según el tipo de experimento, mediante el software GraphPad Prism V5.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU). Se escogió una $p=0,05$ como nivel de significación.

RESULTADOS

4



RESULTADOS

Los resultados se han dividido en 2 apartados:

- A. Glicodendrímeros y dendrímeros derivados de fósforo como vectores no virales en inmunoterapias basadas en células dendríticas.
- B. Dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano como potenciales microbicidas anti-VIH.



**GLICODENDRÍMEROS Y DENDRÍMEROS DERIVADOS
DEL FÓSFORO COMO VECTORES NO VIRALES EN
INMUNOTERAPIAS FRENTE AL VIH BASADAS EN
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

RESULTADOS

GLICODENDRÍMEROS Y DENDRÍMEROS DERIVADOS DEL FÓSFORO COMO VECTORES NO VIRALES EN INMUNOTERAPIAS FRENTE AL VIH BASADAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Hasta la fecha se han estudiado, con más o menos éxito, diferentes inmunoterapias frente al VIH basadas en la carga *ex vivo* de CD con diferentes antígenos. Dos de los principales problemas de este tipo de tratamientos es conseguir una carga apropiada del péptido en las CD, así como una adecuada activación de las CD con el antígeno que permita una respuesta celular aumentada. Se ha demostrado una estrecha relación de estos factores, de manera que una mayor carga antigénica por parte de las CD está asociada a una respuesta inmune más intensa. En esta Memoria se analiza el uso de dos familias de dendrímeros catiónicos: glicodendrimeros de naturaleza PPI decorados con maltosas y fosfordendrimeros, como posibles agentes transportadores que permitan una mejor captura y carga de las de CD con péptidos antigénicos derivados del VIH. Asimismo, se ha evaluado su seguridad y el efecto de estos dendrímeros sobre las funciones principales de las CD para conocer su potencial uso como vectores no virales de antígenos en inmunoterapias frente al VIH.

A. Caracterización del uso de glicodendrimeros como vectores en células dendríticas

Los glicodendrimeros no son tóxicos para células dendríticas inmaduras y maduras

Se analizó la toxicidad de los tres glicodendrimeros catiónicos: DS-PPIg4-3(NH₂), DS-PPIg4-6(NH₂), OS-PPIg4, y del dendrímero neutro DS-PPIg4 por MTT (Fig. 16). Se consideraron como no tóxicas las concentraciones de los glicodendrimeros que tenían una viabilidad celular mayor al 80%, utilizándose el dextrano como control negativo de muerte. Las CD se trataron 24h con un rango de concentraciones de estos glicodendrimeros de 1 a 20µM. En las CDi los dendrímeros no fueron tóxicos a la concentración de 20µM, la concentración más alta analizada, a excepción del glicodendrimeros DS-PPIg4-6(NH₂), que no fue tóxico a la concentración de 10µM (Fig. 16A). Sin embargo, los glicodendrimeros fueron más tóxicos en las CDm. Sólo el glicodendrimeros DS-PPIg4-3(NH₂) no fue tóxico a la concentración de 20µM, mientras que DS-PPIg4 y DS-PPIg4-6(NH₂) fueron no tóxicos a 10µM y el glicodendrimeros OS-PPIg4, el de mayor carga neta, fue no tóxico a la concentración de 2µM (Fig. 16B). En función de estos valores se estableció la concentración máxima de trabajo para cada uno de los compuestos: 20µM para el dendrímero DS-PPIg4-3(NH₂), 10µM para los dendrímeros DS-PPIg4 y DS-PPIg4-6(NH₂) y 1µM para el glicodendrimeros OS-PPIg4.

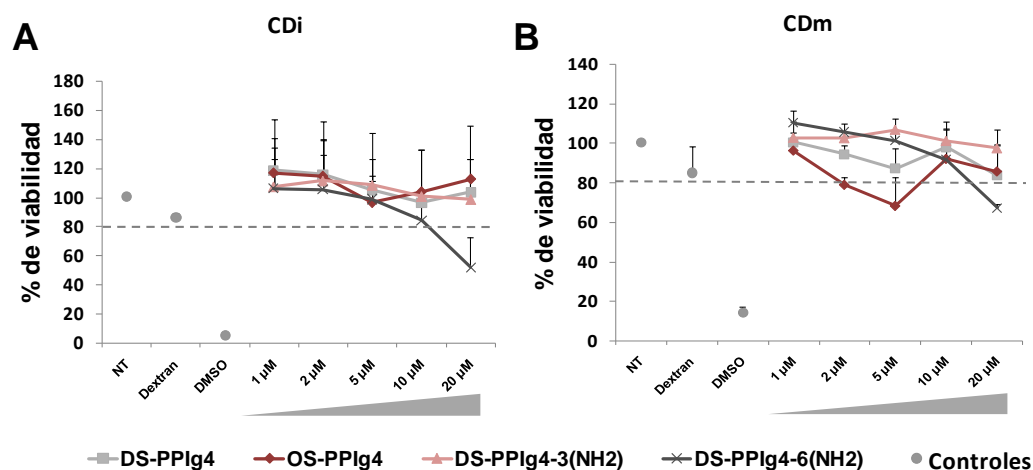


Figura 16. Toxicidad de los glicodendrimeros PPIg4 en CDi y CDm. Viabilidad de CDi (**A**) y CDm (**B**) tras su tratamiento con los dendrimeros. Dextrano 20μM y DMSO 10% se usaron como controles negativos y positivos de muerte celular, respectivamente. Se realizó un ensayo de MTT tras 24h de exposición de las células a los dendrimeros. Se estableció el 80% de viabilidad como límite de toxicidad para todos los compuestos. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los glicodendrimeros forman complejos con péptidos derivados del VIH

Debido a la posible utilización de estos dendrimeros como vectores para el transporte de antígenos del VIH, se estudió la capacidad de los cuatro glicodendrimeros de interactuar con péptidos antigénicos aniónicos derivados del VIH, ya que la naturaleza catiónica de sus cargas podría permitir interacciones electrostáticas con estos péptidos aniónicos²²¹ (Fig. 17). La capacidad de estos dendrimeros para formar complejos es un punto clave en el diseño de vacunas en el área de la nanomedicina.

Para el estudio de las interacciones glicodendrimeros-péptidos se midieron cambios en la fluorescencia polarizada de tres péptidos derivados del VIH marcados fluorescentemente: Gp160, P24 y Nef, en ausencia o presencia de los cuatro glicodendrimeros (Fig. 17A). Un incremento en los valores de fluorescencia polarizada indica una disminución de la movilidad de las moléculas fluorescentes como resultado de su unión no covalente con los dendrimeros. Los resultados muestran que la utilización de concentraciones crecientes de los glicodendrimeros producen un cambio de los valores de fluorescencia polarizada en los tres péptidos marcados, con la excepción de la interacción del OS-PPIg4, glicodendrímtero catiónico, y DS-PPIg4, dendrímtero neutro, con el péptido Gp160 y de la interacción entre el DS-PPIg4 y el péptido Nef (Fig. 17A-b y -c, paneles de la derecha). Sin embargo, se observaron cambios importantes en la polarización cuando se utilizó el péptido P24 con cualquiera de los cuatro glicodendrimeros estudiados (Fig. 17A-a). Por tanto, de los tres péptidos ensayados, el P24, que es el péptido que tiene una secuencia de aminoácidos más corta, es el que mostró una mayor capacidad de establecer interacciones con la superficie catiónica o neutra de los glicodendrimeros.

Para confirmar la asociación entre el péptido P24 y los glicodendrimeros se realizó un análisis por electroforesis de la formación de estos complejos a diferentes ratios de carga. En el caso de la formación de los complejos se produjo una neutralización de las cargas del péptido P24

observándose en el gel un retardo en su migración en relación al péptido no complejo. Los cuatro glicodendrimeros produjeron un retardo de la movilidad en el gel del péptido P24 (Fig. 17B).

Estos resultados confirmaron la capacidad de los glicodendrimeros de establecer complejos con el péptido P24 del VIH, por lo que se seleccionó este péptido para su utilización en los siguientes experimentos a realizar. Además, se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares para determinar los ratios péptido/dendrimer más eficaces. Se analizó la capacidad de distintos ratios carga:carga entre péptido/dendrimer para incrementar la captura del antígeno (péptido P24) en el interior de las CD. En función de los resultados preliminares se seleccionó un ratio carga:carga de 1:4 para los dendrimeros catiónicos DS-PPIg4-3(NH₂) y DS-PPIg4-6(NH₂), un ratio 1:8 para el glicodendrimer catiónico OS-PPIg4 y un ratio molar 1:1 para el dendrimer neutro DS-PPIg4.

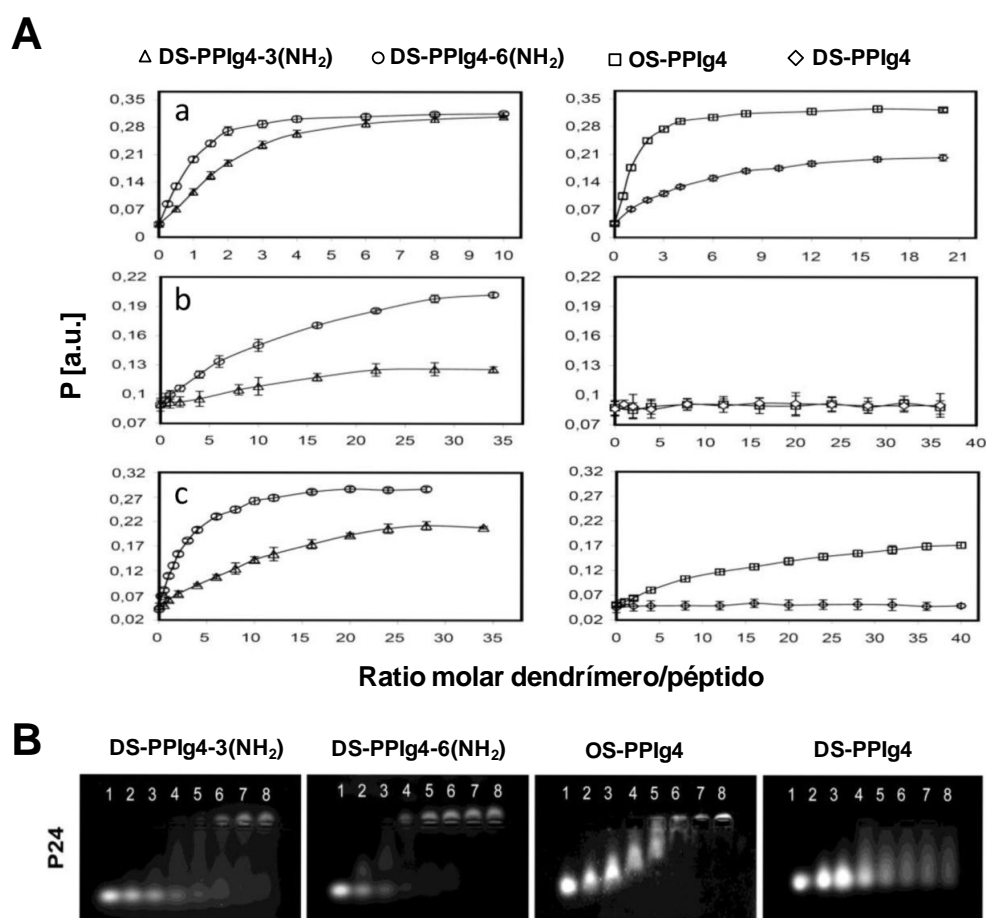


Figura 17. Formación de los complejos glicodendrimeros/péptidos fluorescentes derivados del VIH. **(A)** Cambios en la fluorescencia polarizada de los péptidos derivados del VIH P24 (a), Gp160 (b), Nef (c) tras la adición de los glicodendrimeros a ratios molares dendrimer/péptido crecientes. Triángulos- DS-PPIg4-3(NH₂), círculos- DS-PPIg4-6(NH₂), cuadrados- OS-PPIg4, rombos- DS-PPIg4. Los resultados muestran la media \pm SD de tres experimentos independientes. **(B)** Análisis de la formación de los complejos entre el péptido P24 fluorescente y los glicodendrimeros. Los complejos se formaron a los siguientes ratios molares dendrimer/péptido: (2)-1:1; (3)-2:1; (4)-4:1; (5)-6:1; (6)-8:1; (7)-10:1; (8)-12:1. El carril 1 muestra la migración del péptido sin complejar.

Los glicodendrimeros incrementan la captura de péptidos de las células dendríticas inmaduras y maduras

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la formación de los dendriplex péptido/glicodendrímico, se estudió si las CD captaban más eficientemente el péptido P24 cuando estaba complejado en forma de dendriplex en comparación a cuando se encontraba libre (Fig. 18). La detección de la captura del péptido P24 por las CD se realizó por citometría de flujo. Para asegurar que la señal observada era debida al péptido P24 internalizado, se realizó un lavado ácido de las CD con el objetivo de eliminar los péptidos adheridos a la superficie celular²²².

Un $23,88 \pm 9,3\%$ de las CDi internalizaron el péptido P24 cuando no estaba complejado con los glicodendrimeros, tras 2h post-incubación (Fig. 18A). Se detectaron menores señales de entrada del péptido P24 en las CDm, ya que éstas tienen menor capacidad para capturar antígenos que las CDi ($4,93 \pm 2,7\%$ de CDm positivas a las 2h post-incubación) (Fig. 18B). No se observó un aumento de la captura del péptido P24 en CDi y CDm cuando se complejó con el glicodendrímico neutro DS-PPIg4 en comparación con el péptido P24 solo. Sin embargo, sí que se observó un aumento en la captura antigénica por las CD cuando el péptido P24 se complejó con los tres glicodendrimeros catiónicos.

Cuando las CDi se incubaron con los complejos OS-PPIg4/P24 ($90,58 \pm 8,2\%$), DS-PPIg4-6(NH₂)/P24 ($88,08 \pm 9,5\%$), o DS-PPIg4-3(NH₂)/P24 ($81,21 \pm 13,17\%$), después de 2h de incubación, se observaron valores altos de internalización del péptido P24 (Fig. 18A). En el caso de las CDm, los tres glicodendrimeros catiónicos también incrementaron los valores de captura tras un tiempo de incubación de 2h (OS-PPIg4/P24: $28,73 \pm 17,1\%$; DS-PPIg4-3(NH₂)/P24: $25,54 \pm 17,6\%$; y DS-PPIg4-6(NH₂)/P24: $19,37 \pm 15,2\%$) (Fig. 18B).

Estos datos indican que los tres glicodendrimeros cargados positivamente son capaces de incrementar la internalización de péptidos derivados del VIH en CDi y CDm.

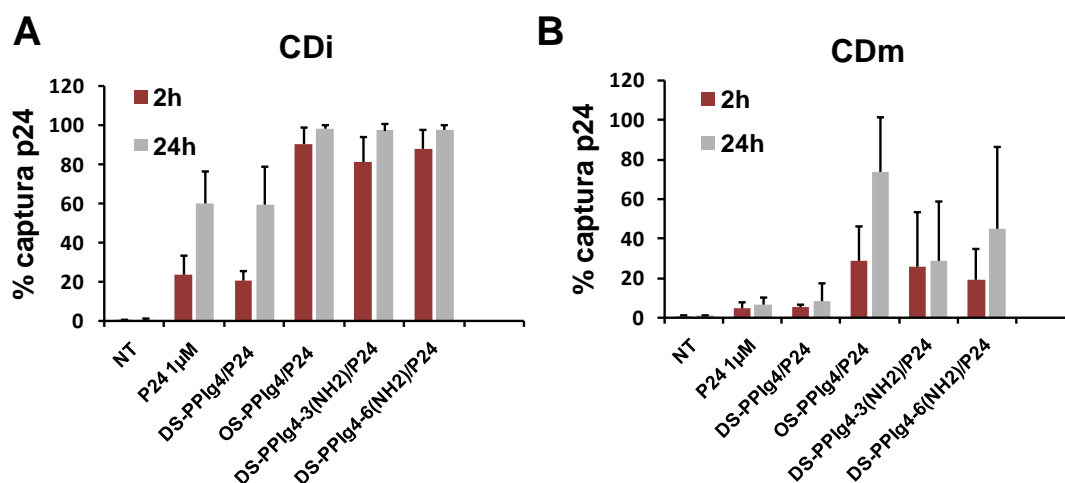


Figura 18. Efecto de los glicodendrimeros sobre la captura del péptido P24 por CDi (A) y CDm (B). Los niveles de captura del péptido sólo o complejado con los dendrimeros en forma de dendriplex fueron seguidos por FACS a las 2h y 24h post-incubación. Los resultados se presentan como porcentaje de células positivas para el fluoróforo. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los glicodendrimeros modifican levemente el fenotipo de células dendríticas inmaduras y maduras

Las funciones de las CD están estrechamente ligadas con su estado de maduración: las CDi están principalmente implicadas en la captura de diferentes patógenos y antígenos, mientras que las CDm tienen una papel crucial en la iniciación de la inmunidad debido a la expresión de moléculas de superficie que permiten su migración hacia los ganglios linfáticos y la presentación y estimulación de células T.

Se evaluó si la captura de los glicodendrimeros o los glicodendriplexes por las CDi podría influir en su fenotipo y en su proceso de maduración *in vitro* mediante el análisis de la expresión de distintos marcadores de superficie implicados en el proceso, como HLA-DR, CD83, CD80 ó CD86. Se compararon los valores de estos marcadores en CDi y CDm tras su tratamiento con los glicodendrimeros, el péptido P24 o los glicodendriplexes. La figura 19A muestra como las CDi tratadas con el dendrímero neutro DS-PPIg4, sólo o formando complejos con P24, presentan un fenotipo similar al de las CDi no tratadas, encontrándose bajos niveles de CD83 y CD86; niveles intermedios CD80 y valores elevados de HLA-DR. Sin embargo, cuando las CDi fueron tratadas con los complejos DS-PPIg4-3(NH₂), DS-PPIg4-6(NH₂) o DS-PPIg4-6(NH₂)/P24 hubo ligeros aunque significativos cambios de los marcadores CD80 y CD83 en comparación con la condición no tratada. Además, cuando las células fueron tratadas con OS-PPIg4/P24, DS-PPIg4-3(NH₂) o DS-PPIg4-6(NH₂), la IFM para el marcador CD86 fue significativamente modificada (Tabla 2). Por tanto, el tratamiento de las CDi con los dendrímeros OS-PPIg4, DS-PPIg4-3(NH₂) y DS-PPIg4-6(NH₂) y sus complejos induce pequeños aunque significativos cambios en los valores de expresión de CD83, CD80 y CD86, con la excepción del glicodendrímero neutro DS-PPIg4, que no cambia su expresión.

La adición de LPS a las CDi induce su maduración y la alta expresión de todos los marcadores de superficie. Las CDi fueron capaces de madurar de forma correcta cuando fueron tratadas con los diferentes glicodendrimeros, el péptido P24 o los dendriplexes, y posteriormente incubadas en presencia de LPS, y no se encontraron diferencias en su fenotipo en relación con las CDm no tratadas (Fig. 19B). Tampoco se encontraron cambios significativos en los valores de IFM de los distintos marcadores con los diferentes tratamientos en relación a las células no tratadas (Tabla 2). Por tanto, ninguno de los dendrímeros afecta ni impide el proceso normal de maduración de las CD. Sin embargo, los glicodendrimeros catiónicos (OS-PPIg4, DS-PPIg4-3(NH₂) y DS-PPIg4-6(NH₂)) sí que modifican los valores de expresión de los marcadores de CDi, pudiendo tener algún tipo de efecto sobre su funcionalidad. Esto debe ser evaluado para garantizar la seguridad del uso de estos dendrímeros en inmunoterapias basadas en CD.

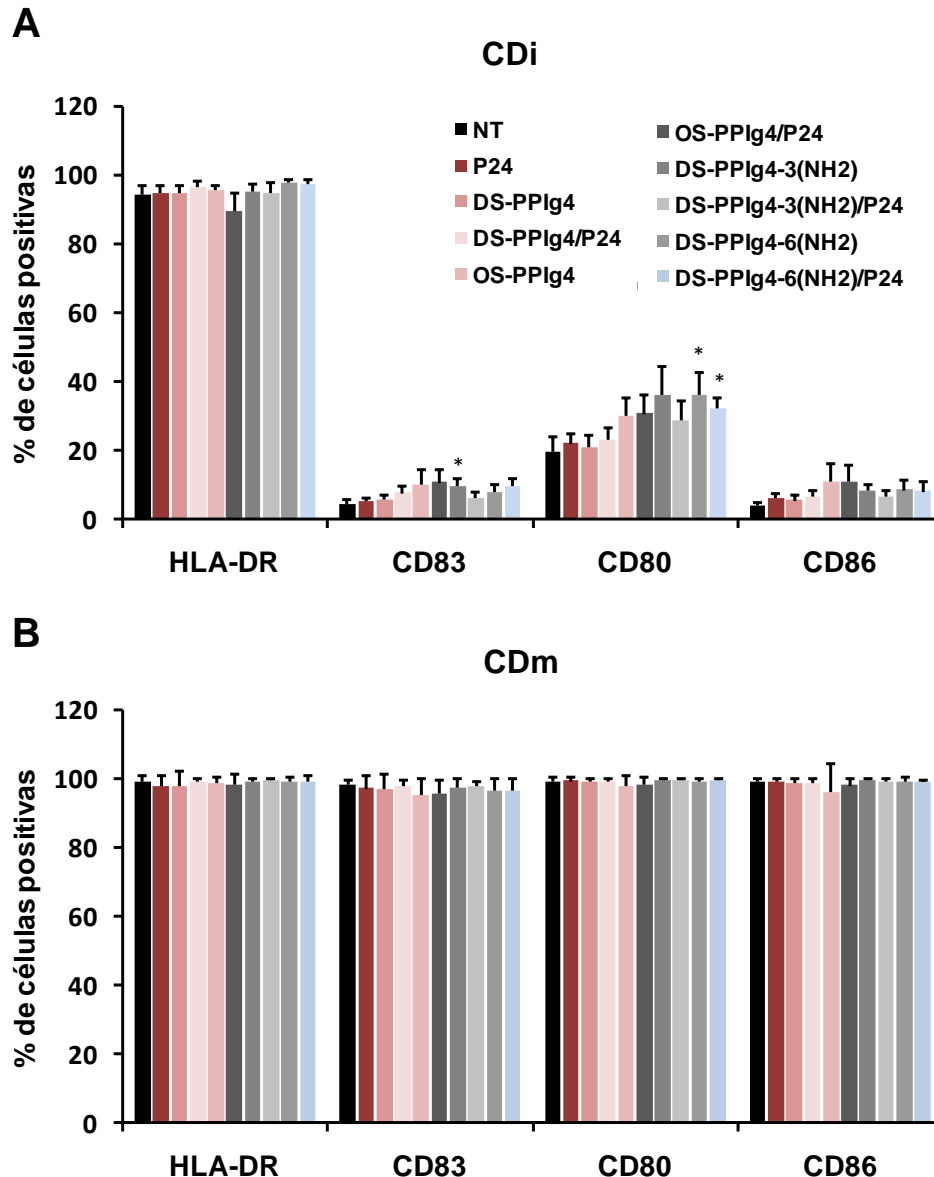


Figura 19. Expresión de marcadores de superficie en CDi y CDm tras su carga con P24, glicodendrimeros o glicodendriplexes. Porcentaje medio de células positivas para los marcadores en CDi (**A**) y CDm (**B**). Las CDm se indujeron con LPS (20ng/ml) y se analizaron por FACS a las 48h de su tratamiento con LPS. Resultados procedentes de 4 donantes independientes. NT= CD no tratadas (* $p < 0,05$ en comparación con NT).

La captura de los complejos glicodendrímtero/P24 favorece la migración de las células dendríticas maduras

Un punto clave de las inmunoterapias basadas en el uso de CD es que las CDm, una vez inyectadas en el paciente, sean capaces de migrar desde el sitio de inyección hasta los órganos linfoides secundarios para estimular a las células T y activar una respuesta inmune. Se estudió el efecto del tratamiento con el péptido P24, los glicodendrimeros o los dendriplexes sobre la capacidad de migración de las CD. Se excluyó en este ensayo, así como de estudios posteriores, al glicodendrímtero

neutro DS-PPIg4 debido a su baja capacidad para incrementar la captura del péptido P24 en CDi y CDm.

CDi	NT	P24	OS-PPIg4	OS-PPIg4/ P24	DS-PPIg4	DS-PPIg4/ P24	DS-PPIg4- 3(NH ₂)	DS-PPIg4- 3(NH ₂)/P24	DS-PPIg4- 6(NH ₂)	DS-PPIg4- 6(NH ₂)/P24
HLA-DR	16.19 ±2.75	14.13 ±1.93	14.90 ±1.62	14.24 ±1.90	13.43 ±1.39	13.81 ±1.86	14.18 ±1.76	14.06 ±2.11	15.86 ±1.67	14.30 ±1.74
CD83	1.47 ±0.28	1.66 ±0.31	1.53 ±0.33	1.70 ±0.23	1.70 ±0.41	1.54 ±0.27	2.02 ±0.37	2.01 ±0.43	1.84 ±0.40	1.85 ±0.32
CD80	5.94 ±0.58	6.31 ±0.62	6.44 ±0.61	6.77 ±0.55	6.02 ±0.57	6.26 ±0.54	6.75 ±0.59	6.40 ±0.66	6.59 ±0.63	6.79 ±0.57
CD86	4.58 ±0.38	5.37 ±0.39	5.88 ±0.64	6.77 ±0.48*	5.21 ±0.56	5.32 ±0.48	6.56 ±0.46*	6.31 ±0.69	6.61 ±0.75*	7.45 ±0.38*
CDm	NT	P24	OS-PPIg4	OS-PPIg4/ P24	DS-PPIg4	DS-PPIg4/ P24	DS-PPIg4- 3(NH ₂)	DS-PPIg4- 3(NH ₂)/P24	DS-PPIg4- 6(NH ₂)	DS-PPIg4- 6(NH ₂)/P24
HLA-DR	17.35 ±1.53	18.94 ±1.58	17.97 ±1.73	18.54 ±1.76	18.91 ±1.74	18.24 ±1.51	18.27 ±1.78	19.90 ±1.54	19.56 ±1.46	20.91 ±2.48
CD83	4.95 ±1.02	4.98 ±1.04	4.60 ±1.04	4.54 ±0.98	5.05 ±0.99	4.98 ±0.97	4.68 ±1.08	4.56 ±0.95	4.32 ±0.96	4.34 ±0.96
CD80	25.99 ±3.19	25.58 ±2.97	24.27 ±3.55	26.04 ±2.60	25.40 ±2.75	26.14 ±2.88	25.86 ±3.43	25.76 ±3.14	23.39 ±2.34	24.45 ±2.41
CD86	14.58 ±1.84	14.24 ±1.71	13.96 ±1.96	14.98 ±1.59	14.30 ±1.61	14.66 ±1.65	14.70 ±1.95	14.67 ±1.84	12.83 ±1.33	13.70 ±1.43

Tabla 2. IFM de los marcadores de superficie expresados en CDi y CDm tras su carga con el péptido P24, los glicodendrimeros o los glicodendriplexes. Las CDm se indujeron con LPS (20ng/ml) y se analizaron por FACS a las 48h de su tratamiento con LPS. Resultados procedentes de 4 donantes independientes. NT = CD no tratadas (*p < 0,05 en comparación con NT).

En estos ensayos de quimioatracción *in vitro* las CDi apenas fueron capaces de migrar hacia las quimioquinas CCL19 y CCL21 (Fig. 20A-B) mientras que las CDm fueron capaces de migrar eficientemente hacia la quimioquina CCL19, incluso cuando se incubaron en presencia de los distintos glicodendrimeros y glicodendriplexes. En el caso de CCL21, cuando las CDm fueron tratadas con los glicodendrimeros o con el péptido sólo, se observó un descenso de la migración, que fue del 25% en el caso del tratamiento con el glicodendrimeros DS-PPIg4-3(NH₂) (en comparación a las CDm no tratadas) (Fig. 20B).

Ya que no todas las CDm captan el péptido P24 o los glicodendriplexes en la misma cantidad, se puede pensar que el nivel de internalización de estos antígenos en cada una de las células podría afectar a su capacidad de migración. Por ello, se comparó por citometría la presencia del péptido P24 internalizado en la población total de CDm antes de la migración y en la población de células migradoras recolectadas de la cámara basal del sistema de transwell (Fig. 20C). El porcentaje de CDm positivas para el péptido fue claramente diferente en las poblaciones de células migradoras y no migradoras, tanto cuando el estímulo migratorio era CCL21 como CCL19. La mayoría de las células migradoras presentaban valores de P24 sensiblemente mayores que los de las poblaciones iniciales no migradoras, mostrando una preferencia de las células cargadas con el péptido a migrar. Estos datos sugieren una mejor capacidad de migración de las células con altos valores de antígeno internalizado, y por tanto, de las que son tratadas con los diferentes glicodendriplexes.

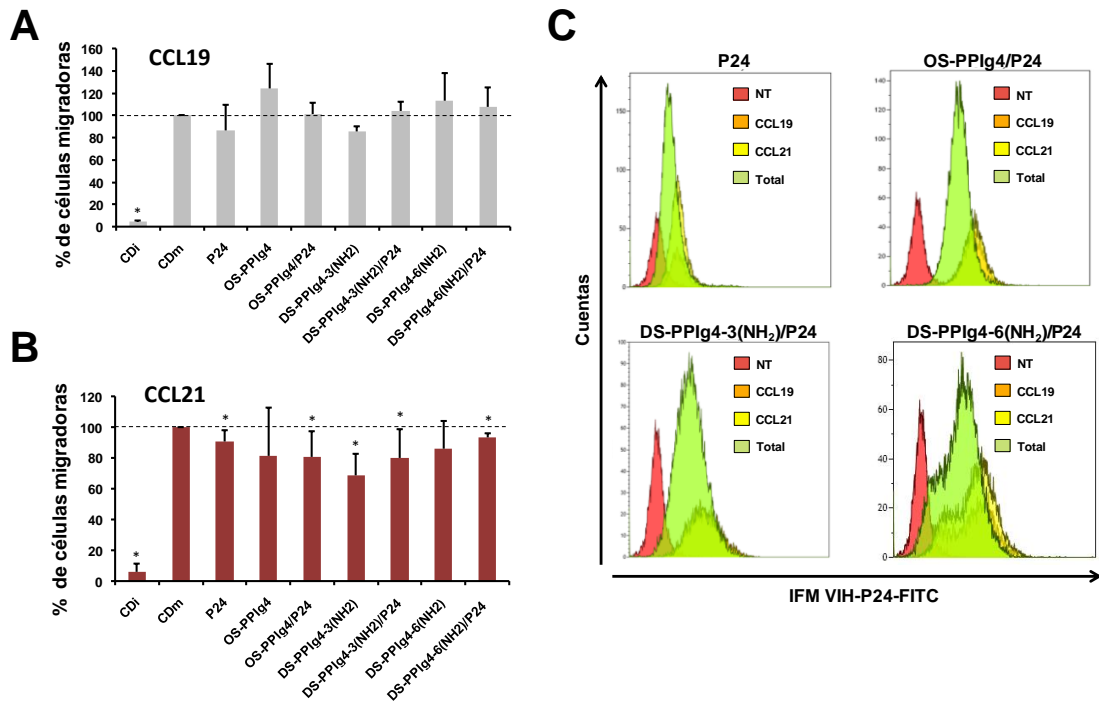


Figura 20. Migración de CD tras su tratamiento con péptido P24, glicodendrimeros o glicodendriplexes. La capacidad quimiotáctica de las CDm se analizó en un sistema de transwells conteniendo CCL19 (A) o CCL21 (B). Tras 3h de migración, se recolectaron las células migradoras de la cámara basal y se contaron durante 60s por FACS. Se representa el porcentaje de células migradoras tratadas con el péptido, dendrimeros o dendriplexes en relación a la migración de las CDm sin tratar. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. (C) Histogramas representando las diferencias en la IFM entre la población inicial (=total, antes de la migración) y la población de células migradoras cuando éstas se encontraban cargadas con P24 sólo o con los glicodendriplexes. NT representa la población de células migradoras en ausencia de tratamiento con los dendrimeros. La representación mostrada corresponde a un experimento representativo de los tres.

Los glicodendrimeros no modifican la capacidad de las células dendríticas maduras de estimular la proliferación de células T

Otra de las funciones primordiales de las CDm es su habilidad para estimular a las células T naïve y desencadenar una respuesta inmune celular.

En base a los cambios observados en el fenotipo y en la migración de las CD cuando éstas se encontraban cargadas con los glicodendrimeros o los glicodendriplexes, se estudió también el efecto de los glicodendrimeros sobre la capacidad estimuladora de las CD sobre los linfocitos T (Fig. 21). 10.000 CDm cargadas o no con los glicodendrimeros, el péptido P24 o los glicodendriplexes se co-cultivaron durante 7 días con 50.000 células T naïve alogénicas CD4+CD45RA+ tratadas previamente con CFSE. La proliferación de estas células T, medida como pérdida de la señal del CFSE, se midió a los 7 días post-cultivo por citometría. Células T CD4+ naïve no activadas y células T CD4+ naïve activadas con PHA se usaron como control negativo y positivo de proliferación, respectivamente. Las CDm cargadas con los glicodendrimeros, el péptido P24 o los glicodendriplexes indujeron la proliferación de las células T naïve en valores comparables a los de las CDm sin tratar, por lo que los

glicodendrimeros no alteran la capacidad de las CDm de estimular *in vitro* a células T naïve alogénicas.

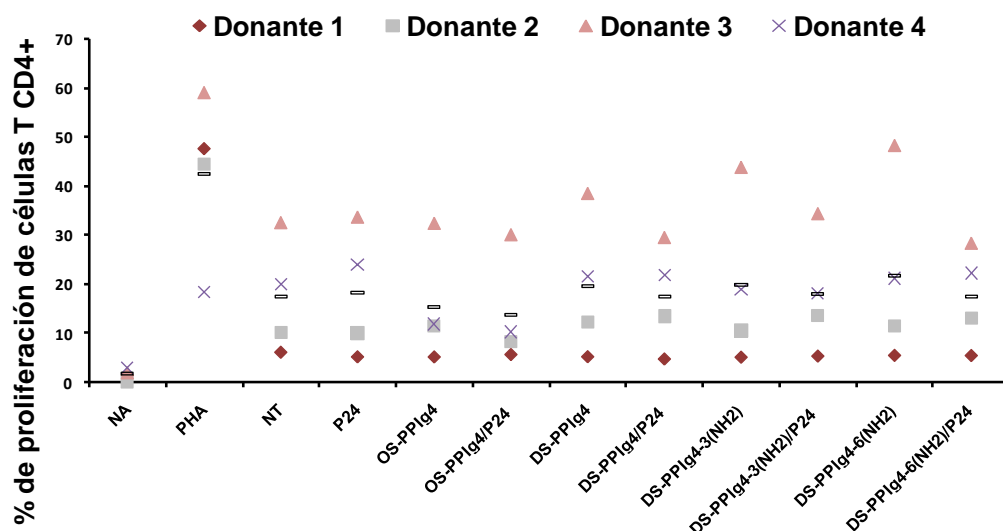


Figura 21. Estimulación alogénica de células T por CD tratadas con los glicodendrimeros. 10.000 CDm cargadas con los glicodendrimeros, el péptido P24 sólo o los glicodendriplexes fueron co-cultivadas con 50.000 células T naïve CD4+ alogénicas marcadas con CFSE e incubadas durante 7 días. La proliferación celular fue seguida por citometría. El porcentaje de proliferación se calculó como el porcentaje de células T CD4+ que habían perdido el marcaje de CFSE. Los datos representan los resultados de cuatro experimentos independientes. La barra negra representa la media de los diferentes experimentos.

Los glicodendrimeros modifican el perfil de secreción de citoquinas de las células dendríticas maduras

La activación de las CDm induce la rápida expresión de determinadas citoquinas imprescindibles en el correcto desencadenamiento de la respuesta inmune. Se estudió la secreción por parte de las CDm de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6 y IL-12p70, y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 a las 24h de su tratamiento con los diferentes glicodendrimeros y glicodendriplexes. Estas citoquinas son esenciales para mantener un adecuado balance entre una respuesta de tipo Th1 o Th2, y por tanto juegan un papel crucial en el direccionamiento de la respuesta inmune hacia un perfil más humoral o celular.

La mayoría de las citoquinas (IL-1 β , IL-17A, IL-6 e IFN- γ) no se detectaron en el medio de cultivo de las CD. Sólo se detectaron ligeros valores de IL-2, IL-8 e IL-12p70, y elevados niveles de IL-10 y TNF- α . Los valores de citoquinas fueron muy bajos en uno de los donantes estudiados (donante 1, Fig. 22A-C). La expresión general de IL-12p70, citoquina proinflamatoria, no cambió en 2 de los 3 donantes (Fig. 22A). Por el contrario, los valores de TNF- α , también una citoquina de tipo proinflamatorio, cambiaron fuertemente en 2 de los 3 donantes (Fig. 22B). El tratamiento de las CDm con los complejos DS-PPIg4-3(NH₂)/P24 o DS-PPIg4-6(NH₂)/P24 indujo un incremento en la secreción de TNF- α . Sin embargo, los tratamientos con OS-PPIg4/P24 o DS-PPIg4/P24 no produjeron cambios

en la producción de IL-12p70 o TNF- α , con la excepción de uno de los donantes, donde se apreció una disminución en los valores de IL-12p70 o TNF- α .

Además, la citoquina IL-10 fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos de 2 de los 3 donantes (Fig. 22C). Los niveles de secreción de esta citoquina proinflamatoria no cambiaron cuando las CDM se trataron con DS-PPIg4/P24, pero sí cuando se trataron con los complejos OS-PPIg4/P24 o DS-PPIg4-6(NH₂)/P24, induciendo una ligera reducción de su secreción. Se encontraron disminuciones de en torno a un 12,5% y un 25% en la producción de IL-10 cuando las CDM fueron tratadas con DS-PPIg4-3(NH₂) o con el dendriplex DS-PPIg4-3(NH₂)/P24, respectivamente.

A pesar de la disparidad encontrada entre las CDM de los distintos donantes, el tratamiento de las CD con los glicodendrimeros conduce hacia una mayor secreción de citoquinas de tipo proinflamatorio, como el TNF- α , asociada a una menor producción de citoquinas de tipo antiinflamatorio, como la IL-10, sugiriendo un perfil activado y proinflamatorio de estas CD.

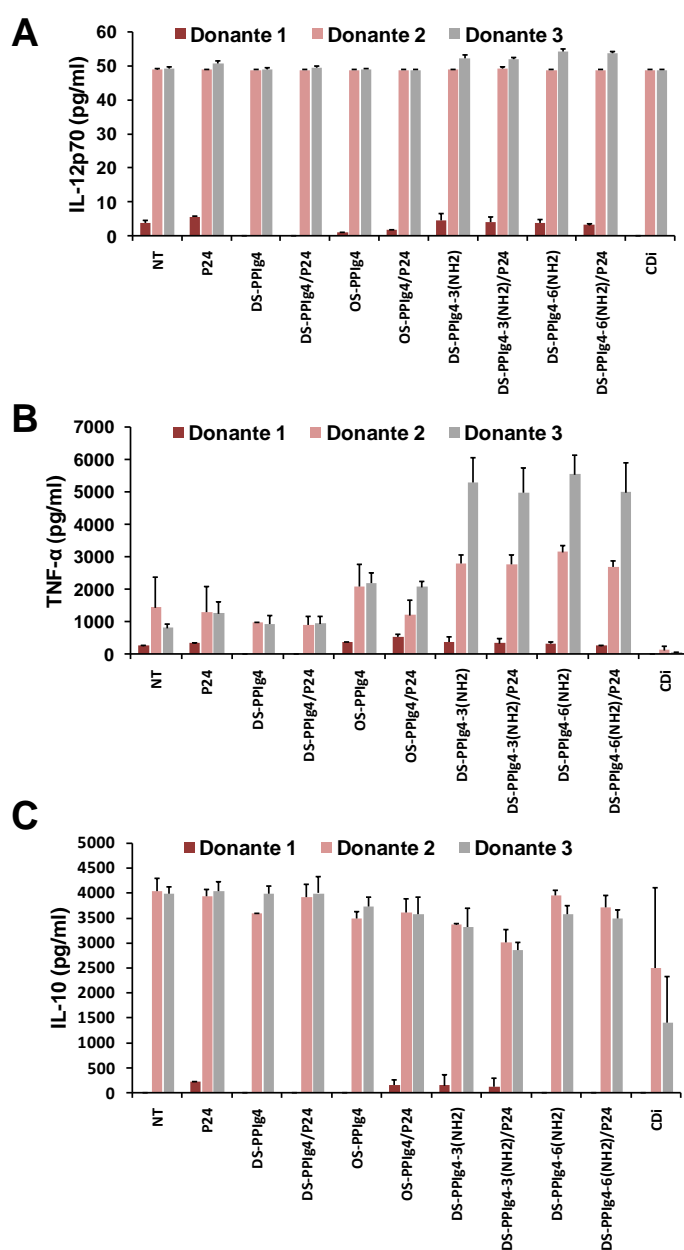


Figura 22. Producción de citoquinas por CDM tras su estimulación durante 24h con el péptido P24, los glicodendrimeros o los glicodendriplexes. La cuantificación de los niveles de las citoquinas IL-12p70 (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) en los sobrenadantes de los cultivos se realizó por citometría. Se representan los valores obtenidos en tres donantes diferentes.

B. Caracterización del uso de fosforodendrimeros como vectores en células dendríticas

Para la evaluación de la seguridad y el potencial de los dendrimeros derivados del fósforo como agentes para el transporte de moléculas antigénicas en inmunovacunas derivadas de CD se usó el mismo procedimiento que para la caracterización de los glicodendrimeros.

Los fosforodendrimeros son capaces de establecer complejos con péptidos derivados del VIH

La medida de la fluorescencia polarizada se volvió a emplear como método para determinar la unión entre los dendrimeros y los péptidos (Fig. 23). Se analizaron cambios en la fluorescencia polarizada de los péptidos fluoresceinados derivados del VIH P24 (A), Gp160 (B) y Nef (C) en presencia o ausencia de los fosforodendrimeros catiónicos de generación G2 y G3. El dendrimer $\text{julo-G}_4\text{-NH}^+$ de cuarta generación no se utilizó en este tipo de pruebas al estar marcado fluorescentemente con el mismo fluorocromo que los péptidos, lo que nos impediría distinguir la señal específica de los péptidos de la del dendrimer. Concentraciones gradualmente mayores de los dendrimeros de fósforo $\text{G}_2\text{-NH}^+$ y $\text{G}_3\text{-NH}^+$ produjeron cambios en los valores de fluorescencia polarizada de todos los péptidos debido a una unión efectiva entre ellos. Estos datos se confirmaron mediante ensayos de migración de estos complejos en geles de agarosa (Fig. 24). $\text{G}_2\text{-NH}^+$ y $\text{G}_3\text{-NH}^+$ retardan la migración de los tres péptidos estudiados. Sin embargo, en función del dendrimer usado, se encontraron diferencias significativas en los patrones de migración.

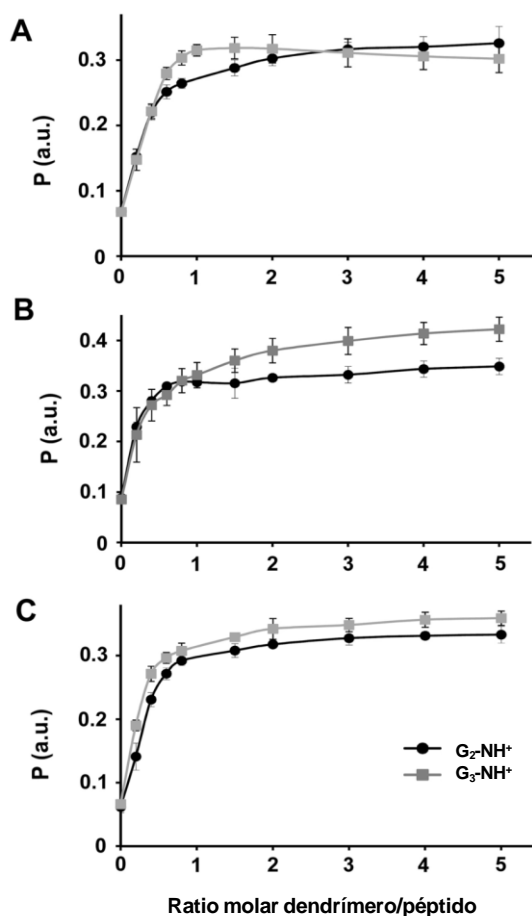


Figura 23. Cambios en la fluorescencia polarizada de los péptidos derivados del VIH P24, (A), Gp160, (B) y Nef, (C) tras su incubación con los fosforodendrimeros catiónicos a ratios molares crecientes dendrimer/péptido. Círculos – $\text{G}_2\text{-NH}^+$, cuadrados – $\text{G}_3\text{-NH}^+$. Los resultados representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

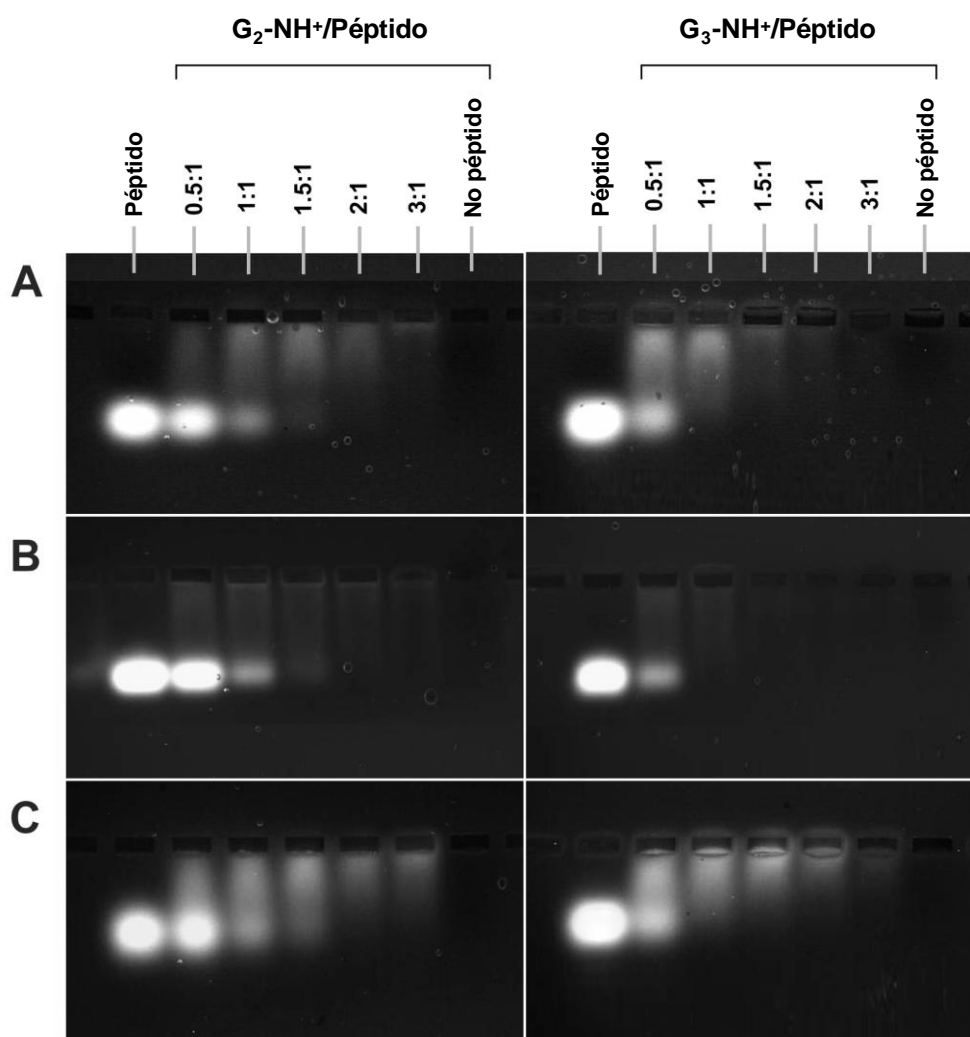


Figura 24. Análisis de la formación de los complejos entre los péptidos fluoresceinados derivados del VIH P24 (A), Gp160 (B) y Nef (C) y los fosforodendrimeros catiónicos. Los complejos se formaron a los siguientes ratios molares dendrímero/péptido: 0,5:1; 1:1; 1,5:1; 2:1 y 3:1.

La complejación de los tres péptidos con el fosforodendrímero G_2-NH^+ fue prácticamente completa al ratio molar dendrímero/péptido de 1,5:1 y total al ratio 2:1. En el caso del G_3-NH^+ , la total formación de los complejos con todos los péptidos se produjo al ratio molar de 1:1. De los tres péptidos estudiados, Gp160 es el que muestra una mejor capacidad de establecer complejos con los dendrímeros, al ser el que presenta un mayor retardo en el movimiento de migración durante la electroforesis y una mejor retención (Fig. 24B). En el caso de los otros dos péptidos, siempre se aprecia una migración residual en el gel, y es el péptido Nef el que presenta una menor capacidad de unión a los dendrímeros (Fig. 24C). Por tanto, el fosforodendrímero policationico de tercera generación, que es el que presenta mayor número de cargas en su superficie, es el que presenta una mejor habilidad para la formación de complejos.

Los fosforodendrimeros tienen una alta toxicidad en células primarias humanas

Tras comprobarse la capacidad de los dendrimeros derivados del fósforo de unirse a los péptidos derivados del VIH, se determinó su toxicidad en diferentes células primarias humanas, tales como CMSP o CDi derivadas de monocitos, tras 24h de exposición mediante un ensayo de MTT (Fig. 25).

El dendrimeros G_2-NH^+ no fue tóxico en ambos tipos celulares a concentraciones menores de $5\mu M$, mientras que G_3-NH^+ no fue tóxico a concentraciones por debajo de $2\mu M$ (Fig. 25A). El dendrimeros julo- G_4-NH^+ , que es que presenta una mayor carga neta, es que resultó más letal, siendo tóxico en CDi a la concentración de $0,5\mu M$ (Fig. 25B). Estas toxicidades son más elevadas que las obtenidas en el caso de los glicodendrimeros. En base a estos datos se establecieron las concentraciones de trabajo máximas no tóxicas para cada uno de los compuestos: $2\mu M$ para G_2-NH^+ , $1\mu M$ para G_3-NH^+ y $0,4\mu M$ para julo- G_4-NH^+ . Además, los péptidos P24 y Gp160 se seleccionaron para su uso en el resto de pruebas, usándose a una concentración de $1\mu M$. Los ratios de trabajo dendrimeros/péptido se establecieron en función de sus cargas. Para el dendrimeros G_2-NH^+ se eligieron los ratios 8:1 y 10:1 (correspondientes a las concentraciones de $1,33\mu M$ y $1,67\mu M$ de G_2-NH^+ , respectivamente), para el G_3-NH^+ los ratios de 12:1 y 20:1 (correspondientes a las concentraciones de $0,5\mu M$ y $1\mu M$, respectivamente), y para el dendrimeros julo- G_4-NH^+ los de 4:1 y 6:1 (correspondientes a las concentraciones de $0,2\mu M$ y $0,3\mu M$, respectivamente).

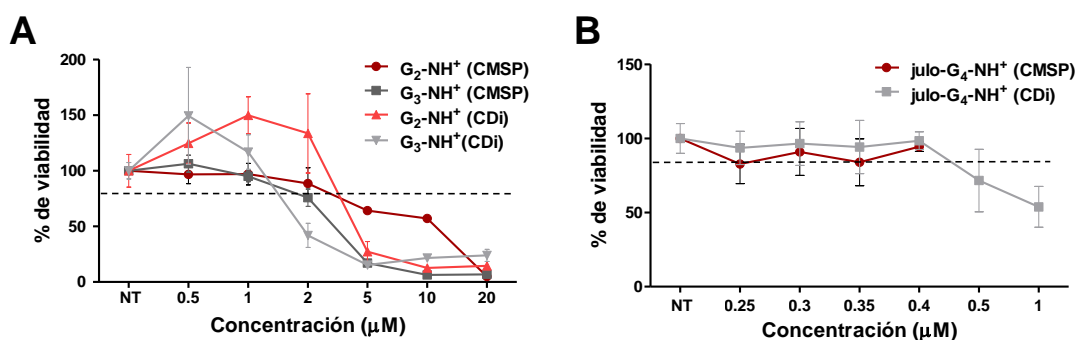


Figura 25. Toxicidad de los fosforodendrimeros. (A) Toxicidad de G_2-NH^+ y G_3-NH^+ en CMSP y CDi. Se realizó un MTT tras 24h de exposición de las células a los fosforodendrimeros. (B) Toxicidad del fosforodendrimeros fluorescente de cuarta generación (julo- G_4-NH^+) en CMSP y CDi tras 24h de incubación. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los fosforodendrimeros incrementan la captura de péptidos derivados del VIH en células dendríticas

Al igual que con los glicodendrimeros, se evaluó la capacidad de los fosforodendrimeros de incrementar la captura e internalización de péptidos antigénicos del VIH en CD. Gp160 o P24 marcados con el TAMRA se complejaron con los dendrimeros G_2-NH^+ , G_3-NH^+ y julo- G_4-NH^+ a diferentes ratios carga:carga, usando concentraciones no tóxicas de los dendrimeros. Su captura en CD se analizó por citometría (Fig. 26). Los dendriplexes de todas las generaciones de fosforodendrimeros incrementan la captura de los péptidos en CDi. El dendrimeros julo- G_4-NH^+ fue el que mostró una menor capacidad de aumentar la internalización antigénica ($19,95\pm 3,43\%$ de CDi positivas para el ratio 6:1) en comparación con el péptido solo ($5,65\pm 6,48\%$ de CDi positivas), mientras que G_3-NH^+

fue el que permitió valores de captura más altos ($89,38 \pm 12,45\%$ de CDi positivas para el ratio 20:1 a las 24h post-incubación). El dendrímero G_2-NH^+ también aumenta el nivel de captura de los péptidos en CDi ($24,94 \pm 21,06\%$ a ratio 10:1). Los fosforodendrímeros G_2-NH^+ y G_3-NH^+ permiten también una mayor captura de los péptidos derivados del VIH en CDm (G_2-NH^+ : $13,33 \pm 9,23\%$ en el ratio 10:1; G_3-NH^+ : $86,29 \pm 10,03\%$ a ratio 20:1) respecto a la internalización del péptido solo ($2,05 \pm 1,27\%$ de CDm positivas). Esto no ocurre en el caso del julo- G_4-NH^+ , cuyos dendriplexes no son capaces de mejorar de manera significativa la captura del péptido por CDm.

Los datos mostrados indican como todos los fosforodendrímeros catiónicos son capaces de ayudar a mejorar la internalización de los péptidos derivados del VIH en CDi, y también en CDm, a excepción del G_4-NH^+ . Sin embargo no se encontró una relación directa entre un mayor número de cargas y una mejor captura peptídica.

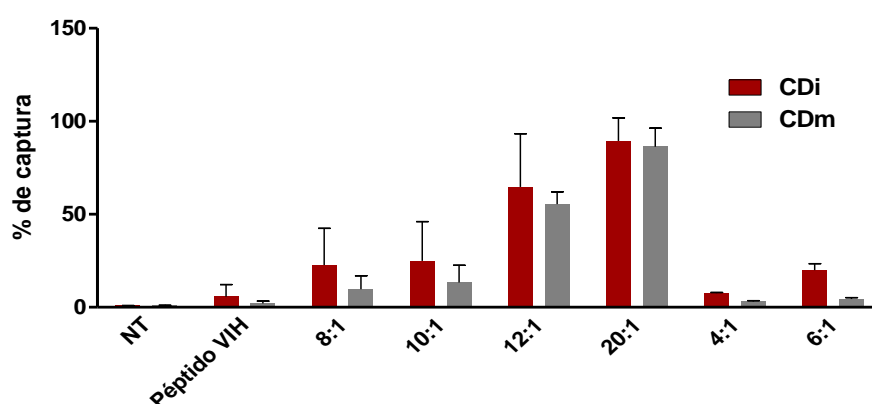


Figura 26. Efecto de los fosforodendrímeros sobre la captura de los péptidos derivados del VIH en CD. Los niveles de captura en CDi y CDm tras 24h de tratamiento con los péptidos, los fosforodendrímeros o los fosforodendriplexes a distintos ratios se midieron por citometría. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

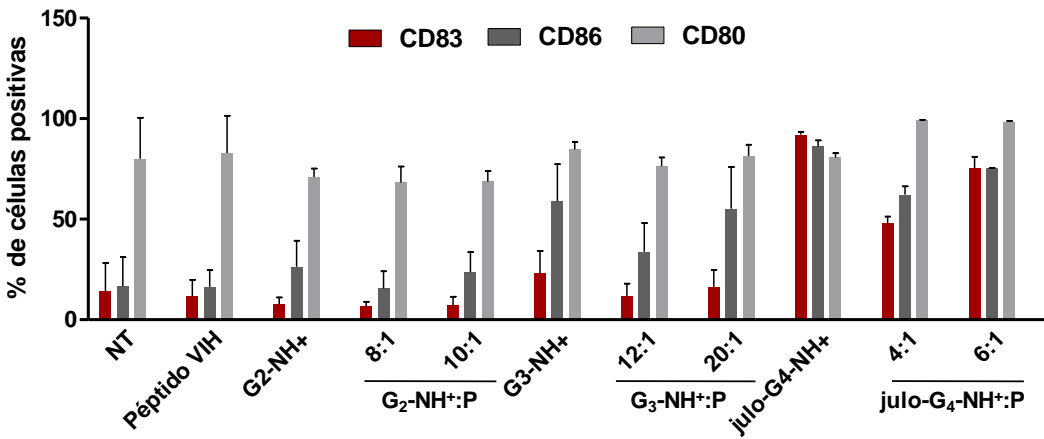
Los fosforodendrímeros modifican el fenotipo de las células dendríticas inmaduras, pero no impiden la correcta maduración de las células dendríticas maduras

Se estudió también si el tratamiento de las CDi con los fosforodendrímeros o los fosforodendriplexes modificaba su fenotipo y patrón de expresión de marcadores de superficie, así como su capacidad para madurar *in vitro*. Se analizó el patrón de expresión de los marcadores de superficie CD83, CD86 y CD80 en CDi y CDm tratadas con los fosforodendrímeros, los péptidos o los fosforodendriplexes (Fig. 27). G_3-NH^+ y sobretudo julo- G_4-NH^+ , así como sus correspondientes dendriplexes fueron capaces de incrementar los valores de expresión de CD83 y CD86 en la superficie de CDi (Fig. 27A), pero no de CD80. G_2-NH^+ no modificó, o lo hizo muy levemente, los valores de expresión de estas moléculas en la superficie de CDi.

Por otra parte, el tratamiento de las CDi con los fosforodendriplexes y su posterior maduración con LPS no indujo cambios en la expresión de los marcadores CD80 y CD86 (Fig. 27B), pero sí se observó una reducción en la expresión de CD83 cuando las CD se cargaron con el dendrímero julo- G_4-NH^+ solo o en forma de complejos con el péptido. Por tanto, las CDi pueden madurar correctamente en presencia de los fosforodendrímeros G_2-NH^+ y G_3-NH^+ o sus dendriplexes tras su activación con LPS, no encontrándose diferencias fenotípicas con la CDm no tratadas. Sin

embargo, debido a que el dendrímero de cuarta generación impide la maduración celular y el dendrímero de tercera generación parece inducir una cierta activación de las CDi, se decidió seguir analizando solamente la actividad del dendrímero G_2-NH^+ de segunda generación, ya que fue el único que no modificó *in vitro* el fenotipo de CDi y CDm.

A



B

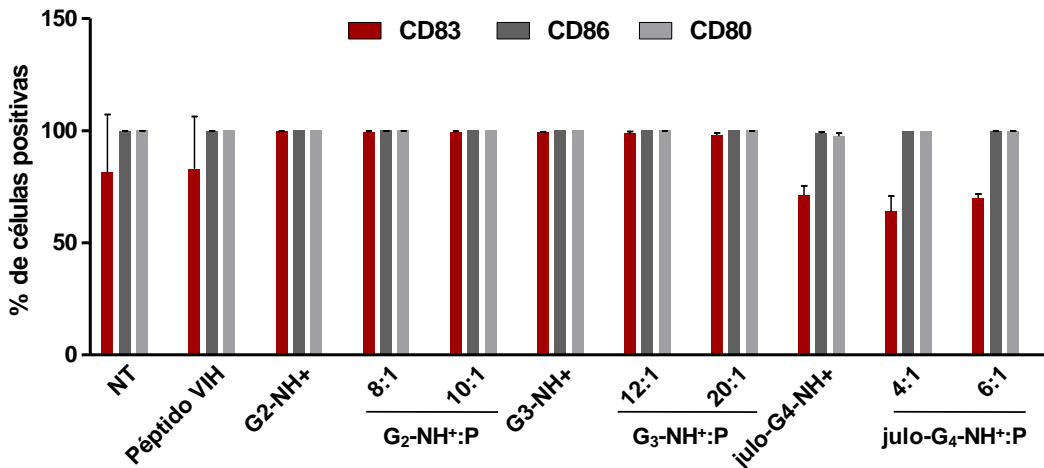


Figura 27. Fenotipo de CDi y CDm después de su tratamiento con los péptidos derivados del VIH, los dendrímeros de fósforo o sus dendriplexes. Expresión de los marcadores de superficie CD83, CD86 y CD80 como porcentaje medio de células positivas en CDi (A) y en CDm (B). La maduración de las CDm se indujo con LPS (20ng/ml) y su análisis por FACS se produjo a las 48h post-tratamiento. Los datos se representan con la media \pm SD de dos experimentos independientes.

El fosforodendrímero de segunda generación G_2-NH^+ modifica las funciones de migración y estimulación de células T en células dendríticas

Como continuación del proceso de análisis de estos compuestos como potenciales transportadores de biomoléculas cargadas antigénicas en terapias frente al VIH, se estudió el efecto de los fosforodendrímeros, concretamente del compuesto de segunda generación G_2-NH^+ , sobre dos de las principales funciones de las CD: su capacidad migratoria y su habilidad para estimular la proliferación de células T naïve (Fig. 28).

Se encontró una menor migración de las CDm hacia las quimioquinas CCL21 y CCL19 cuando éstas se trataron con el dendrímero $G_2\text{-NH}^+$ o sus dendriplexes (Fig. 28A). Esta disminución fue de en torno a un 50% en comparación con las CDm no tratadas o las tratadas únicamente con los péptidos derivados de VIH. El dendrímero $G_2\text{-NH}^+$, por sí mismo, es el responsable de la pérdida de la capacidad migratoria de las CD, no dependiendo este efecto de la presencia del péptido.

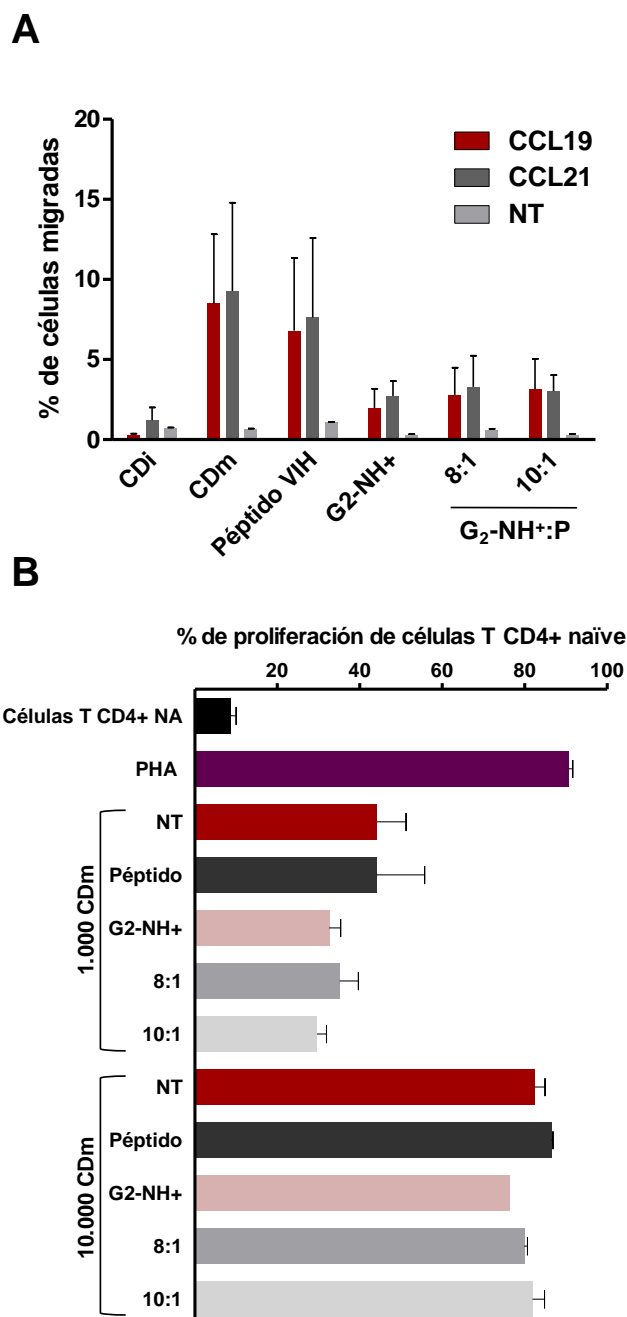


Figura 28. Efecto de los fosforodendrímeros sobre la funcionalidad de CD. **(A)** Porcentaje de migración de CDm tras su tratamiento con los dendrímeros y sus dendriplexes. Se representa el porcentaje de células respecto del total que migraron hacia las quimioquinas CCL19 y CCL21 en un sistema de transwell. Cada condición se testó por triplicado. **(B)** Efecto de los fosforodendrímeros sobre la estimulación alógena de células T por las CD. 1.000 ó 10.000 CDm no tratadas o tratadas con el péptido derivado del VIH, el dendrímero $G_2\text{-NH}^+$ o sus dendriplexes a los ratios de carga 8:1 y 10:1 se co-cultivaron con 50.000 células T alógenas naïve marcadas con CFSE. A los 7 días de cultivo se calculó la proliferación de estas células, medida como porcentaje de células que habían perdido el marcaje por CFSE, mediante citometría. Células T marcadas con CFSE sin tratar o estimuladas con PHA se usaron como controles negativos y positivos de proliferación, respectivamente. Cada condición se analizó por triplicado.

En cuanto a su función estimuladora, las CDm tratadas con el dendrímero $G_2\text{-NH}^+$ o sus dendriplexes fueron capaces de estimular la proliferación de células T, aunque se encontró una pequeña disminución de esta capacidad en el ratio 1:50 CDm:Células T (Fig. 28B). Así por ejemplo, hubo una reducción del 25% en la proliferación de las células T, respecto de la condición no tratada, cuando las CDm fueron incubadas con el dendrímero $G_2\text{-NH}^+$ sólo. Esta disminución también se observó

en el caso de los tratamientos con los dendriplexes, tanto a los ratios de 8:1 como de 10:1 (20% y 30% de disminución de la proliferación en comparación con la condición no tratada). Esto indica que el dendrímero de fósforo de segunda generación G_2-NH^+ afecta a las principales funciones de las CD, disminuyendo su capacidad migratoria y su capacidad de estimulación de las células T.

El fosforodendrímero G_2-NH^+ modifica el perfil de secreción de citoquinas de las células dendríticas maduras

Por último, se estudió el efecto de los fosforodendrímeros en la secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias por parte de las CDm. Estas citoquinas juegan un papel esencial en la adecuada modulación y direccionamiento de la respuesta inmune.

Sólo TNF- α , IL-8 e IL-10 fueron detectadas, observándose fuertes cambios en los patrones de producción de las mismas (Fig. 29). Cuando las células se trataron con el dendrímero G_2-NH^+ , sólo o con su dendriplex a ratio 10:1, se detectaron reducciones del 84% y 68%, respectivamente, en los niveles de secreción de TNF- α (Fig. 29A). En cuanto a la producción de IL-10, cuando las CDm fueron tratadas con el dendriplex a ratio 8:1 no se detectaron cambios respecto a la condición control. Sin embargo, sí que se encontró un descenso en su secreción cuando las células se trataron con G_2-NH^+ y el dendriplex 10:1 (17% y 34%, respectivamente) (Fig. 29B). En el caso de IL-8, cuando las CDm fueron tratadas con el dendrímero de segunda generación o sus dendriplexes a diferentes ratios de carga:carga, se encontró una fuerte disminución en la producción de esta citoquina (Fig. 29C). Es interesante puntualizar que estas disminuciones son debidas exclusivamente al efecto del dendrímeros e independientes del efecto de los péptidos. Por tanto, se puede concluir que el tratamiento de las CDm con los fosforodendrímeros induce un fenotipo no proinflamatorio de las células a través de un fuerte descenso en la producción de IL-8 y TNF- α .

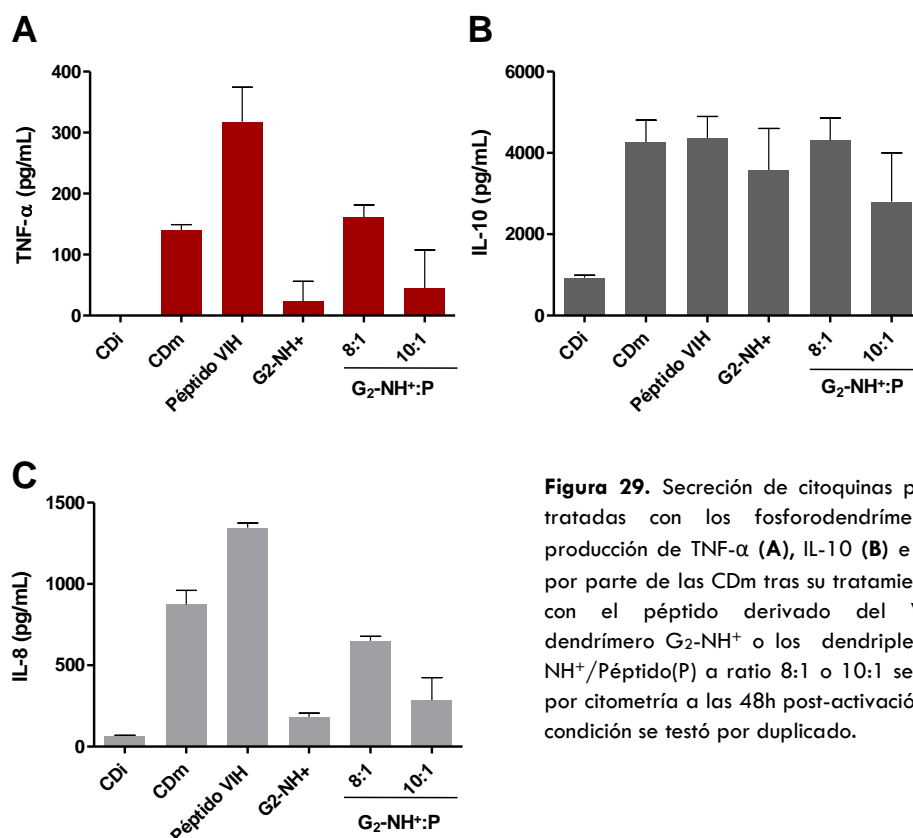


Figura 29. Secreción de citoquinas por CDm tratadas con los fosforodendrímeros. La producción de TNF- α (A), IL-10 (B) e IL-8 (C) por parte de las CDm tras su tratamiento o no con el péptido derivado del VIH, el dendrímero G_2-NH^+ o los dendriplexes G_2-NH^+ /Péptido(P) a ratio 8:1 o 10:1 se analizó por citometría a las 48h post-activación. Cada condición se testó por duplicado.

C. Estudio del efecto inmunoestimulador ex vivo de complejos entre glico y fosforodendrimeros con péptidos derivados del VIH

Una vez caracterizado el potencial de los glicodendrimeros decorados con maltosa y de los dendrimeros derivados del fósforo como transportadores de péptidos virales, así como su efecto sobre las principales características y funciones de estas células, se realizaron una serie de experimentos con el fin de esclarecer si el incremento observado en la captura de los péptidos se traducían realmente en un efecto inmunoestimulador de las CD y en una mayor respuesta inmune. Se escogieron los compuestos DS-PPIg4-3(NH₂) y G₂-NH⁺ como candidatos representativos del grupo de los glicodendrimeros y de los fosforodendrimeros, respectivamente. Para analizar su efecto inmunoestimulador se realizaron co-cultivos entre CD tratadas con complejos formados por estos dendrimeros y una mezcla de los péptidos derivados del VIH P24, Gp160 y Nef con células T autólogas procedentes de pacientes VIH positivos controladores de élite. Se estudió la proliferación específica de células T CD4⁺ y CD8⁺ inducida por las CD (Fig. 30).

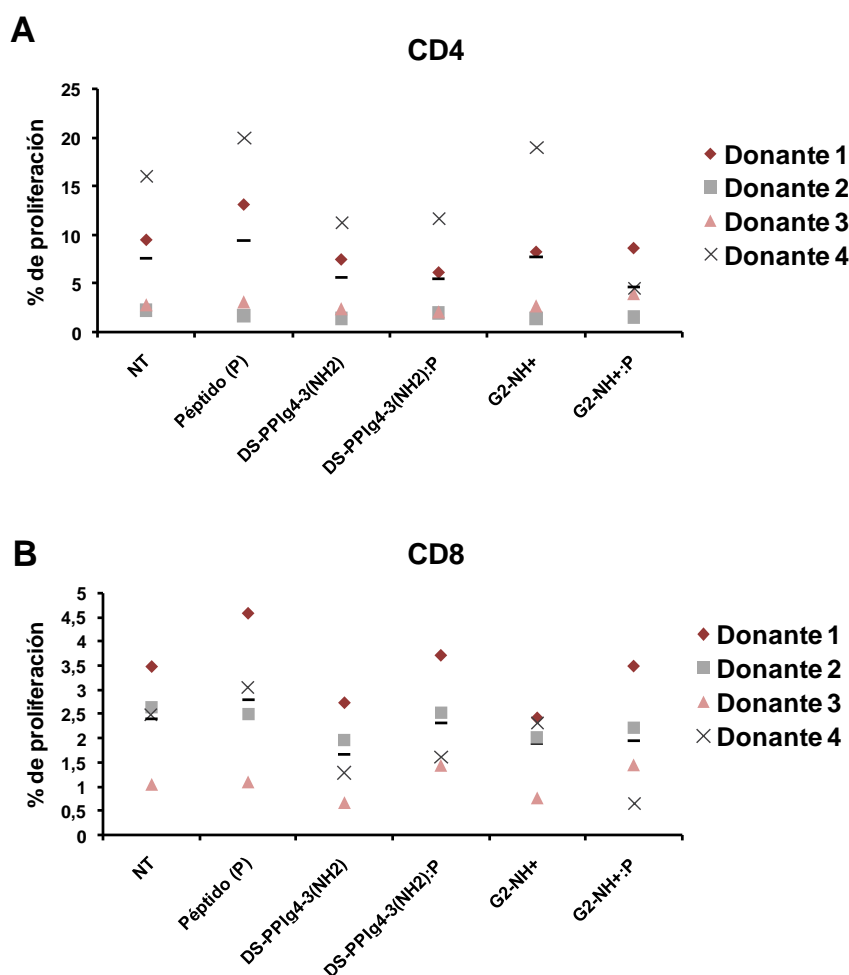


Figura 30. Efecto de glico y fosforodendrimeros sobre la proliferación de células T autólogas ex vivo. La proliferación de células T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) inducida por CD autólogas tratadas con péptidos derivados del VIH, los dendrimeros o dendriplexes fue analizada por citometría a los 7 días post co-cultivo. Los datos muestran los resultados obtenidos a partir de cuatro donantes individuales. La barra negra representa la media de todos los donantes.

No se apreciaron cambios significativos en la proliferación de las poblaciones de células T CD4 y CD8 cuando éstas se incubaron en presencia de las CD no tratadas o con CD tratadas con la mezcla de péptidos, los dendrímeros o sus dendriplexes. Solamente en dos de los donantes se observó una diferencia en la proliferación cuando las células fueron tratadas con los péptidos respecto a la condición no tratada, y en estos casos, ese incremento en la proliferación desapareció cuando las CD fueron incubadas con los dendrímeros o sus dendriplexes. Por tanto, a pesar de que los dendrímeros ayudan a incrementar la captura de antígenos por parte de las CD, éstos no fueron capaces de inducir una mayor activación inmunológica específica en el modelo utilizado.

Para confirmar este resultado, se llevó a cabo otro ensayo de co-cultivo autólogo con los glicodendrímeros. En este caso se realizaron sucesivas rondas de co-cultivo entre CD pulsadas con la mezcla de péptidos y las células T antes de realizar un co-cultivo final entre estas células T y CD tratadas con los glicodendriplexes. Con ello se pretendió amplificar la población de clones de células T capaces de reconocer específicamente a los antígenos estudiados para intentar obtener una mayor estimulación inmune en presencia de los dendrímeros. Sin embargo, de nuevo, no se observaron cambios significativos en la proliferación de las células T cuando éstas se co-cultivaron en presencia de CD no tratadas o tratadas con la mezcla de péptidos, los glicodendrímeros o sus dendriplexes (Fig. 31), descartándose así un efecto de estimulación específica.

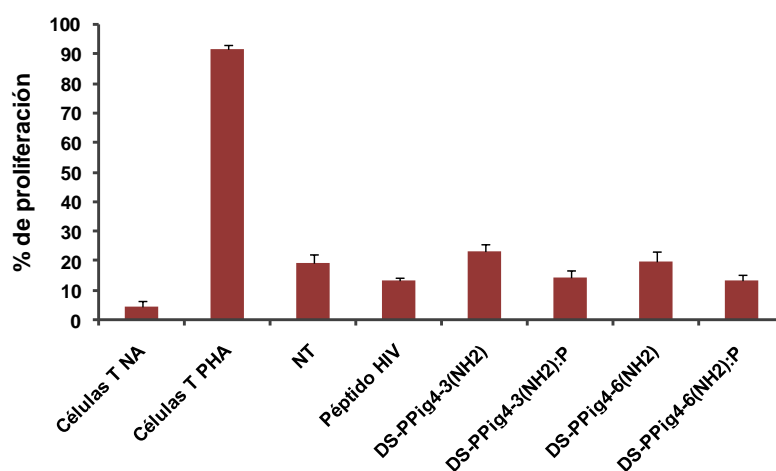


Figura 31. Efecto de los glicodendrímeros sobre la proliferación de células T autólogas tras sucesivas rondas de contacto células T-CD. La proliferación de células T inducida por CD autólogas tratadas con péptidos derivados del VIH, los dendrímeros o dendriplexes fue analizada por citometría a los 7 días post co-cultivo. Se realizaron cuatro rondas de co-cultivo previas entre CD pulsadas con los péptidos y las células T con el fin de estimular la proliferación específica de los clones capaces de reconocer los péptidos usados. Cada condición se analizó por triplicado.

Las investigaciones recogidas en este primer bloque de resultados han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Vacas-Córdoba E., Pion M., Rasines B., Filippini D., Komber H., Ionov M., Bryszewska M., Appelhans D., Muñoz-Fernández MA. **Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies.** *Nanomedicine*. 2013 Mar 15. doi:p11: S1549-9634(13)00096-8. 10.1016/j.nano.2013.03.004. (I.F.: 6,930)

Vacas-Córdoba E., Pion M., Bastida H., Hameau A., Ionov M., Bryszewska M., Caminade AM., Majoral JP., Muñoz-Fernández MA. **HIV-antigens charged on phosphorus dendrimers as tools for tolerogenic DC-based immunotherapy.** *Current Medicinal Chemistry*. (En revisión) (I.F.: 4,07)



DENDRÍMEROS CARBOSILANOS COMO MICROBICIDAS FRENTE AL VIH

RESULTADOS

B- DENDRÍMEROS CARBOSILANOS COMO POTENCIALES MICROBICIDAS FRENTE AL VIH

A. Evaluación de la actividad, seguridad y potencial microbicida de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16.

Debido a la necesidad de buscar nuevas estrategias encaminadas a la prevención de la transmisión del VIH, especialmente por vía sexual, se estudió la actividad antiviral y el potencial uso como microbicidas de una batería de dendrímeros polianiónicos carbosilanos pertenecientes a cuatro familias según la naturaleza de sus grupos funcionales. Se evaluaron 11 dendrímeros con grupos terminales de tipo carboxilato, fosfonato, sulfato y naftilsulfonatos.

“Screening” inicial de los dendrímeros polianiónicos carbosilanos

Con el fin de determinar los dendrímeros con mejor actividad antiviral y por tanto, los mejores candidatos a su posible uso como microbicidas, se realizó inicialmente un ensayo de toxicidad y de inhibición de la infección por el X4 VIH-1_{NL4.3} en CMSP con todos los compuestos. Todos los dendrímeros fueron seguros y ninguno de ellos fue tóxico a concentraciones menores de 5 μ M en CMSP (Fig. 32).

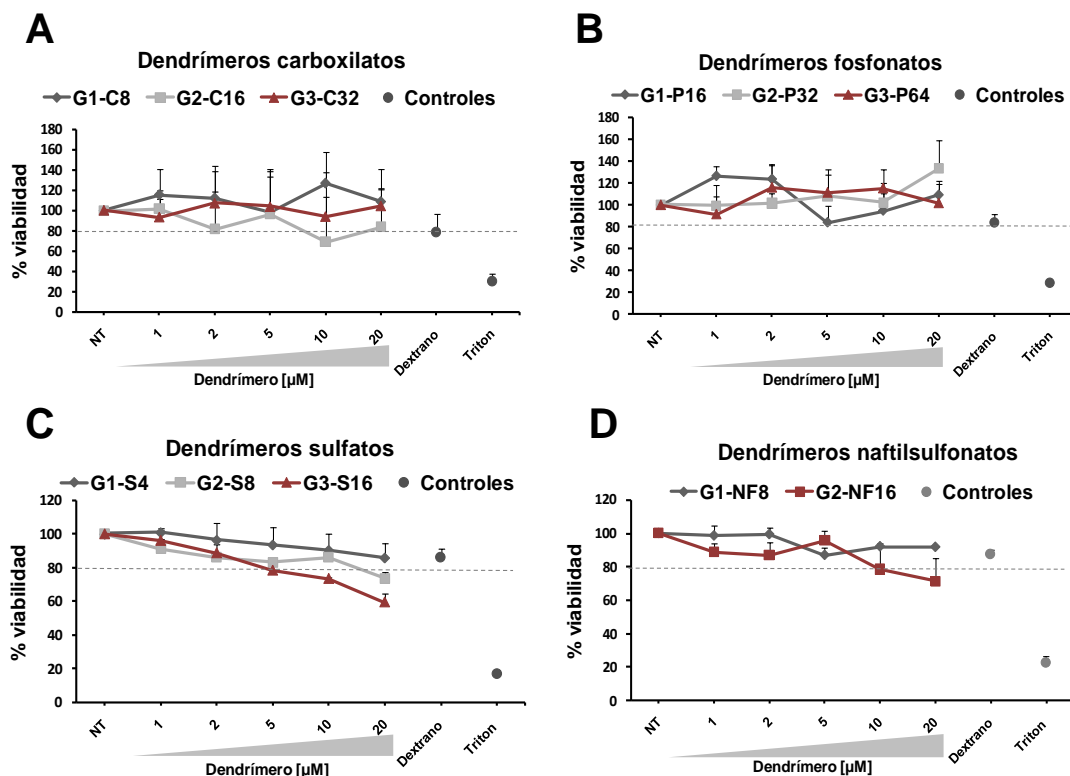


Figura 32. Viabilidad de CMSP tras su tratamiento durante 24h con los dendrímeros carbosilanos polianiónicos pertenecientes a las familias carboxilato (A), fosfonato (B), sulfato (C) y naftilsulfonato (D). Se usó un rango de concentraciones de entre 1-20 μ M para cada uno de los compuestos. Dextrano 20 μ M y Triton X-100 10% se utilizaron como controles negativos y positivos de toxicidad, respectivamente. El 80% de viabilidad se estableció como límite de toxicidad para cada uno de los dendrímeros. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes.

En cuanto al estudio de inhibición, se realizó primeramente un ensayo únicamente con los dendrímeros de mayor generación de cada una de las familias (Fig. 33A). Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 con grupos sulfato y naftilsulfonato, respectivamente, fueron los más eficaces inhibiendo totalmente la infección por el X4 VIH-1_{NL4.3}, incluso a la concentración más baja utilizada de 1 μ M. Los dendrímeros con grupos carboxilatos y fosfonatos fueron menos eficaces, consiguiendo inhibiciones no superiores al 60% en el caso del dendrímero G3-C32. Para estudiar más en detalle el efecto antiviral de todos los miembros de los grupos carboxilato y fosfonato, se realizó un nuevo ensayo de inhibición del X4 VIH-1_{NL4.3}, pero usando concentraciones mayores de cada uno de los dendrímeros (Fig. 33B-C).

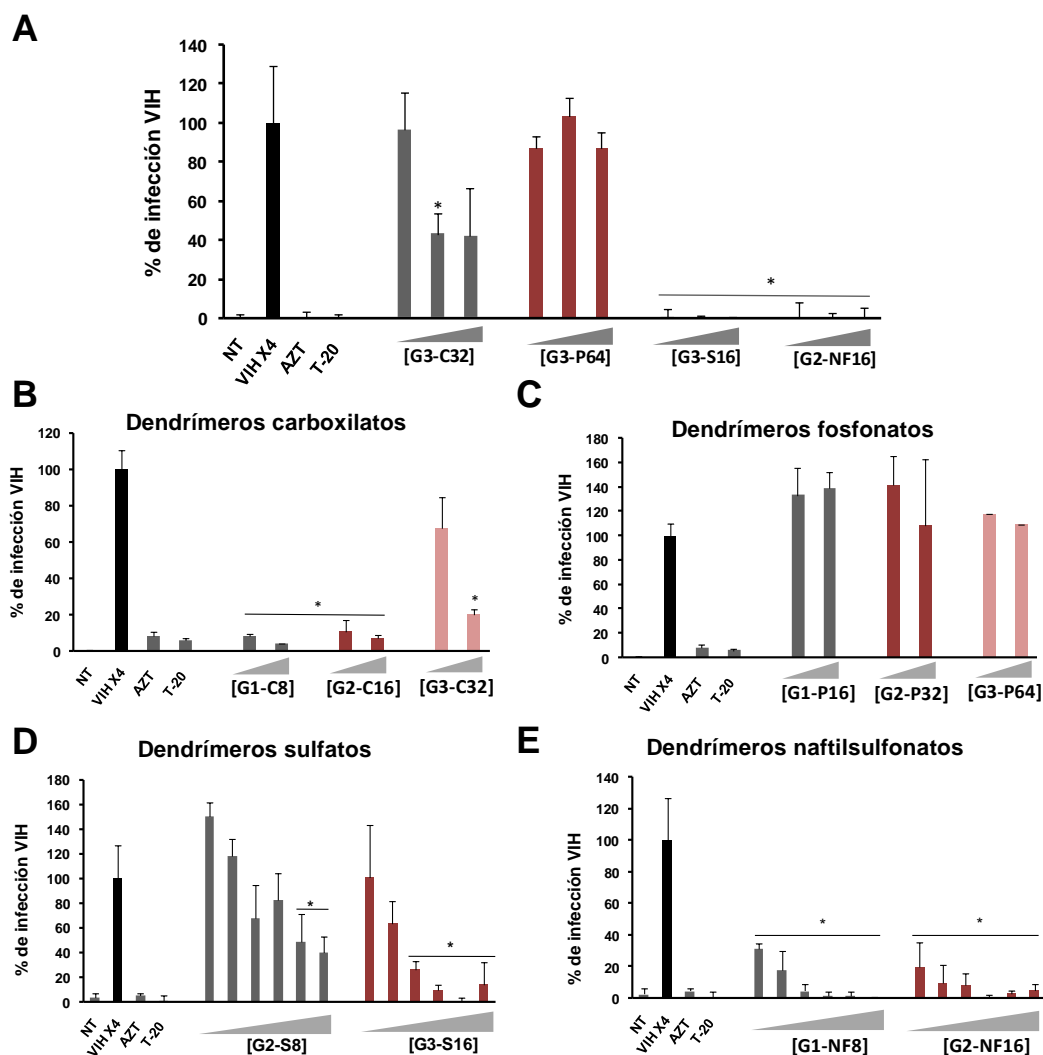


Figura 33. Inhibición del VIH en CMSP por las diferentes familias de dendrímeros carboxilanos polianiónicos. **(A)** Inhibición de X4 VIH-1_{NL4.3} por los dendrímeros de mayor generación de cada una de las cuatro familias. Se usaron concentraciones de 1, 5 y 10 μ M. **(B)** Inhibición de la infección del X4 VIH-1_{NL4.3} por los miembros de las familias de dendrímeros con grupos carboxilato y fosfonato **(C)** terminales. Se usó un rango de concentraciones entre 10 y 20 μ M. **(D)** Inhibición de la infección del X4 VIH-1_{NL4.3} en CMSP por los dendrímeros de las familias sulfato y naftilsulfonato **(E)**. Se usó un rango de concentraciones de entre 0,25-1,5 μ M. AZT y T-20 se usaron como controles positivos de inhibición viral. Cada condición se estudió por triplicado. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs control).

Los dendrímeros con grupos carboxilato de generación 1 y 2 (G1-C8 y G2-C16) inhibieron la infección alrededor de un 90% a la concentración de 10 μ M (Fig. 33B). En el caso de los dendrímeros con grupos fosfonato, ninguno de ellos fue eficaz inhibiendo la infección viral a las concentraciones estudiadas (Fig. 33C). Además, se realizó también un ensayo de inhibición con los distintos miembros de los grupos de dendrímeros con grupos sulfato y naftilsulfonato (Fig. 33D-E). Debido a su alta eficacia en los ensayos anteriores, se usó un rango de concentraciones de 0,25 a 1,5 μ M. Todos los dendrímeros fueron muy eficaces inhibiendo la infección viral, especialmente los de mayor generación.

En base a estos estudios previos, los dendrímeros G3-S16, con 16 grupos sulfato terminales, y G2-NF16, con 16 grupos naftilsulfonato terminales (Fig. 34), se eligieron como los mejores candidatos para continuar con su evaluación como potenciales agentes de uso microbicida.

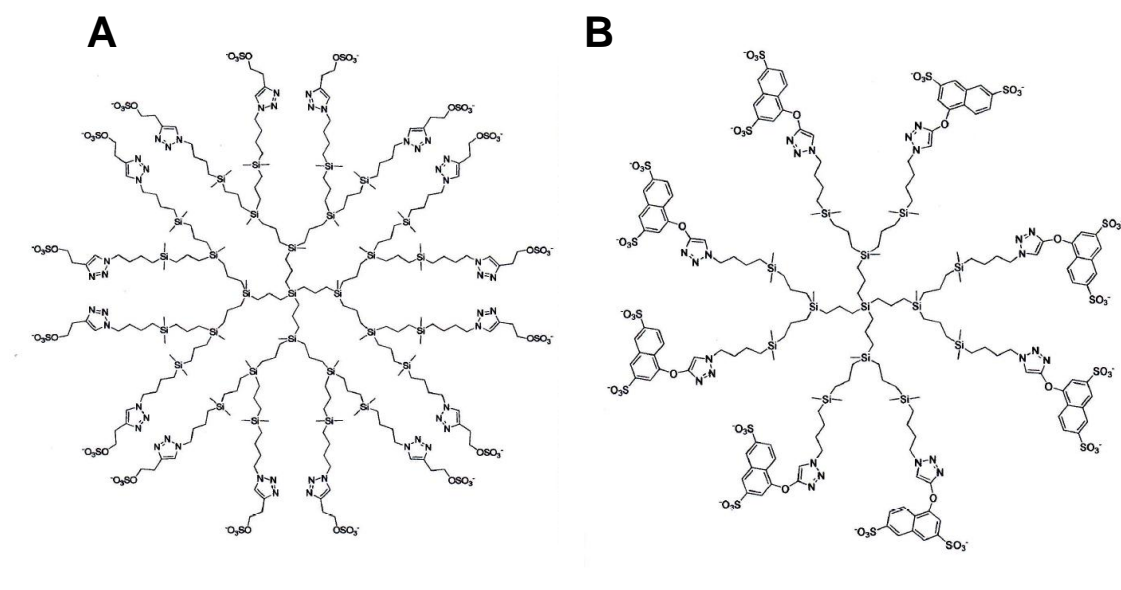


Figura 34. Estructura de los dendrímeros polianiónicos de tipo carboxilano. **(A)** Dendrúmero de tercera generación G3-S16, con 16 grupos sulfato terminales. $C_{256}H_{508}N_{48}Na_{16}O_{64}Si_{16}Si_{29}$; Pm: 6.978,41g/mol. **(B)** Dendrúmero G2-NF16 de segunda generación, con 16 grupos naftilsulfonato terminales. $C_{184}H_{244}N_{24}Na_{16}O_{56}Si_{16}Si_{13}$; Pm: 4.934,02g/mol.

Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 son biocompatibles en distintos tipos celulares

Una de las primeras aproximaciones en el cribado (screening) de nuevos agentes terapéuticos es el estudio de su biocompatibilidad. Debido al posible uso de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 como agentes microbicidas de aplicación tópica vaginal, se analizó en primer lugar su toxicidad en las líneas celulares epiteliales humanas derivadas del tracto genital femenino HEC-1A y VK2/E6E7 (procedentes de útero y vagina, respectivamente) por MTT tras 24h de exposición a distintas concentraciones de cada uno de los dendrímeros (Fig. 35A-B). Ambos dendrímeros no mostraron toxicidad a la concentración de 5 μ M en la línea HEC-1A. En el caso de las células VK2/E6E7, el límite de toxicidad de ambos compuestos fue de 3 μ M. Además, su biocompatibilidad también fue medida por MTT en CMSP humanas, principales dianas del VIH, y en la línea celular U87.CD4.CCR5, que expresa altas cantidades del correceptor CCR5. El dendrúmero G3-S16 no fue tóxico a 5 μ M en CMSP ni a 10 μ M en las células U87.CD4.CCR5. Por su parte, G2-NF16 no fue tóxico a 10 μ M en CMSP ni a

5 μ M en U87.CD4.CCR5. Para confirmar estos resultados, se evaluó la toxicidad de estos compuestos por otra técnica como el MTS en las líneas celulares HEC-1A, HeLa P4.2.R5, TzM.bl y VK2/E6E7 tras 24h de tratamiento (Fig. 35C-D). Ninguno de los dendrímeros fue tóxico a la concentración de 10 μ M en estas líneas, a excepción de en VK2/E6E7, donde el límite de toxicidad fue de 3 μ M. En base a estos resultados, se estableció una concentración de trabajo de 5 μ M para cada uno de los dendrímeros en células primarias así como en las distintas líneas celulares, a excepción de en VK2/E6E7, donde la máxima concentración utilizada fue de 3 μ M.

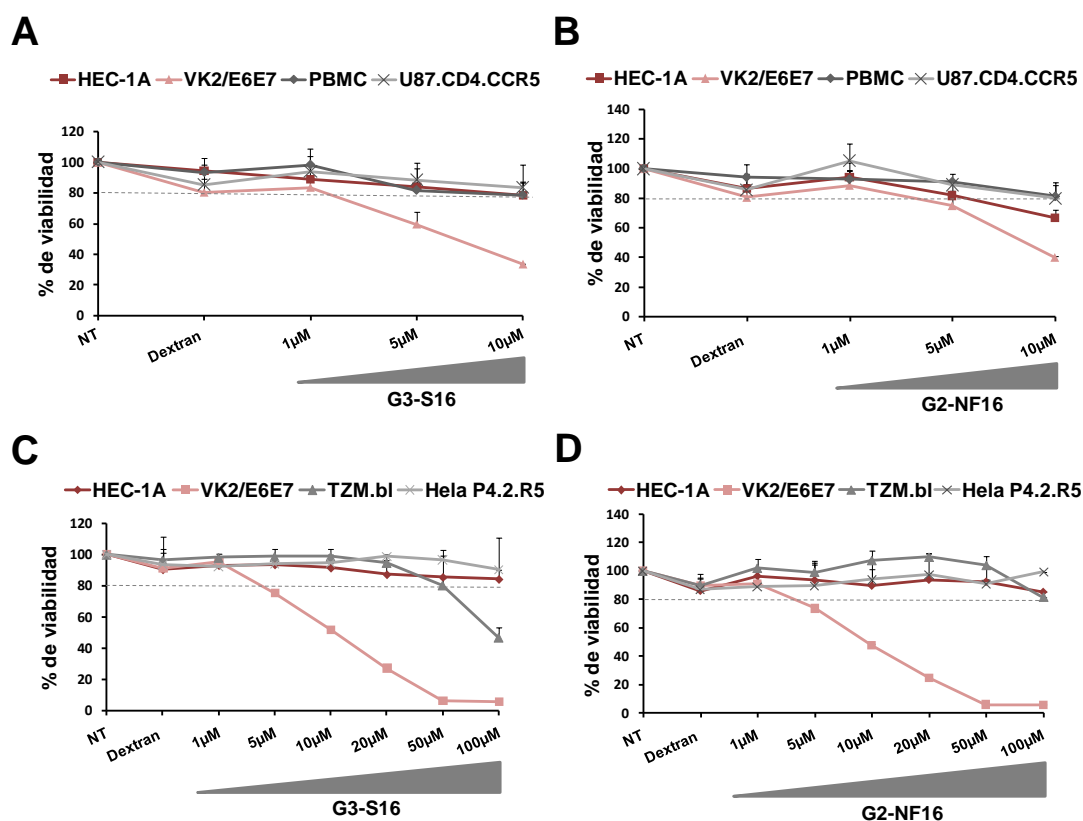


Figura 35. Toxicidad de los dendrímeros carboxilanos polianiónicos G3-S16 y G2-NF16 en células primarias y diversas líneas celulares. **(A)** Ensayo de viabilidad por MTT en las líneas celulares del epitelio vaginal HEC-1A y VK2/E6E7, en CMSP y en U87.CD4.CCR5 después de 24h de exposición al G3-S16. Se evaluó un rango de concentraciones de compuesto entre 1 μ M y 10 μ M. **(B)** MTT de HEC-1A, VK2/E6E7, CMSP y en U87.CD4.CCR5 tras 24h de tratamiento con G2-NF16. **(C)** Ensayo de MTS en HEC-1A, HeLa MAGI P4.2.R5, TzM.bl y VK2/E6E7 tras 24h de exposición a G3-S16. **(D)** Viabilidad por MTS en estos tipos celulares tras un tratamiento de 24h con el dendrímero G2-NF16. Se empleó dextrano 10 μ M como control negativo de muerte celular. Se estableció el umbral de 80% de viabilidad como límite de toxicidad de los distintos dendrímeros. Los datos se representan como media \pm SD de tres experimentos independientes.

G3-S16 y G2-NF16 previenen de la entrada viral en células epiteliales

Las células del epitelio urogenital constituyen habitualmente la primera barrera de defensa frente al VIH durante la transmisión por vía sexual del virus. Estas células tienen una baja capacidad de infección por el VIH, pero sin embargo, tienen la capacidad de captar partículas virales y transferir estas partículas infecciosas a otras células de la mucosa.

Para evaluar el potencial microbicida de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16, se estudió el papel de estos compuestos impidiendo la internalización de partículas virales en células HEC-1A y VK2/E6E7 pretratadas con los mismos. En células HEC-1A, se observó una reducción del 51% y 61% en la internalización del X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{WT/BAL}, respectivamente, a la concentración más alta de G3-S16, en comparación con las células infectadas no tratadas (Fig. 36A), mientras que en el caso de las VK2/E6E7, se encontró una inhibición de la internalización de un 53% y 64% para los aislados virales X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{WT/BAL} (Fig. 36C). Este mismo efecto inhibitorio se observó también en el dendrímero G2-NF16. Se encontró una reducción del 49%, en la internalización de ambos aislados del VIH en HEC-1A y una reducción del 70% para X4 VIH-1_{NL4.3} y del 68% para R5 VIH-1_{WT/BAL} en VK2/E6E7 (Fig. 36B-D). Ambos dendrímeros son capaces de disminuir la internalización de ambos aislados virales al mismo nivel o a niveles superiores al del control positivo suramin, una molécula con actividad antiviral²²³. Además, mientras que el G2-NF16 actúa de manera similar en cepas X4 y R5, el G3-S16 bloquea más eficientemente la internalización del R5 VIH-1_{WT/BAL} en ambos tipos de células epiteliales. Por tanto, ambos dendrímeros tienen la capacidad de bloquear parcialmente la entrada de partículas virales en el interior de células epiteliales, previniendo la infección desde sus primeras etapas.

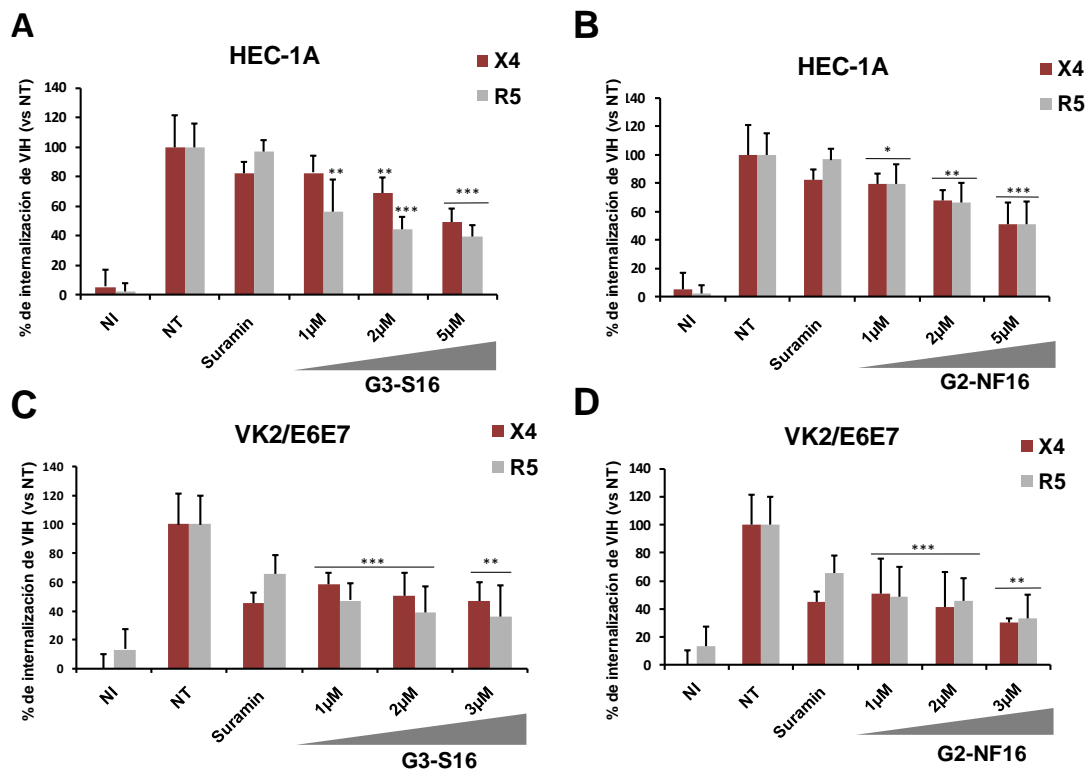


Figura 36. Inhibición de la internalización del VIH en células del epitelio genital femenino. (A) Células HEC-1A o VK2/E6E7 (C) fueron tratadas con G3-S16 durante 1h antes de su infección con VIH-1. 3h después de su exposición al virus, las células fueron lisadas con 0,1% Triton X-100, cuantificándose la cantidad de virus en el lisado mediante ELISA. Se usaron las cepas virales X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{WT/BAL}. (B) Efecto del dendrímero G2-NF16 en HEC-1A y VK2/E6E7 (D) sobre la internalización del VIH. Se usó suramin a la concentración de 10μM. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs control). Los datos se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

G3-S16 y G2-NF16 disminuyen la transmisión de partículas virales libres y de virus asociado a células a través de una monocapa de células epiteliales

Se evaluó también si los dendrímeros eran capaces de prevenir la transmisión del virus, ya sea libre o internalizado en células, a través de la barrera epitelial. Para ello se empleó un sistema de transwell o doble cámara en el que se estudió si partículas libres de VIH-1 o virus R5 asociado a CMSP eran capaces de atravesar una monocapa de células epiteliales tras su pretratamiento con los dendrímeros. En base a resultados previos se estableció un tiempo de 7 días para la adecuada formación de la monocapa epitelial sobre la membrana de este sistema de transwell¹⁸². Tras este tiempo, en el caso de la transmisión de virus libre, monocapas de HEC-1A o VK2/E6E7 se trataron durante 1h con los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 y luego se infectaron con X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Se recogió sobrenadante a distintos tiempos de la cámara inferior del sistema y se determinó la cantidad de virus capaz de atravesar la monocapa mediante la cuantificación del antígeno p24⁹⁹ por ELISA.

En la mayoría de los casos se observó un retraso en la transmisión viral cuando las monocapas de células fueron pretratadas con los dendrímeros, especialmente con el G2-NF16 (Fig. 37A-D). Así, en el caso de las HEC-1A, se llegaron a encontrar reducciones del 70% y 86% en la transmisión del X4 VIH-1_{NL4.3} cuando se trataron estas células con G3-S16 y G2-NF16, respectivamente, en la primera hora post-infección (Fig. 37A). En el caso de su infección con el aislado R5, sólo hubo reducciones significativas de la transmisión cuando la monocapa fue pretratada con G2-NF16 (entre un 20-25% durante las 3 primeras horas tras la infección) (Fig. 37B). El dendrímero G3-S16 solo fue capaz de frenar el paso del virus en los primeros 30min (40% de reducción). Por otra parte, ambos dendrímeros fueron capaces de disminuir la transmisión viral del aislado X4 durante las primeras horas postinfección en el caso de una monocapa de VK2/E6E7 (39% y 48% de reducción para G3-S16 y G2-NF16, respectivamente), a pesar de que a las 3h el dendrímero G3-S16 no mostró un efecto protector en comparación con la monocapa no tratada (Fig. 37C). En el caso del tratamiento de VK2/E6E7 frente al R5 VIH-1, se encontró una disminución en la transmisión del 23% y 54% para G3-S16 y G2-NF16 a las 3h (Fig. 37D).

Además, se analizó si los dendrímeros tenían un efecto protector en la transmisión, a través de estas monocapas epiteliales, de CMSP portadoras de partículas virales de tipo R5, que son las mayoritarias en la primo-infección. Se analizó el paso de estas células asociadas al virus cuantificando la infección en CMSP “frescas” localizadas en la cámara inferior del sistema de transwell (Fig. 37E-F). En el caso de las HEC-1A, se obtuvo una reducción en la infección viral de CMSP cuando las células fueron pretratadas con ambos dendrímeros (31% y 15% de reducción en la infección por el VIH para G3-S16 y G2-NF16, respectivamente). El mismo efecto se observó en el caso de las VK2/E6E7 (24% y 22% de inhibición en la transmisión de virus asociado a CMSP para G3-S16 y G2-NF16, respectivamente).

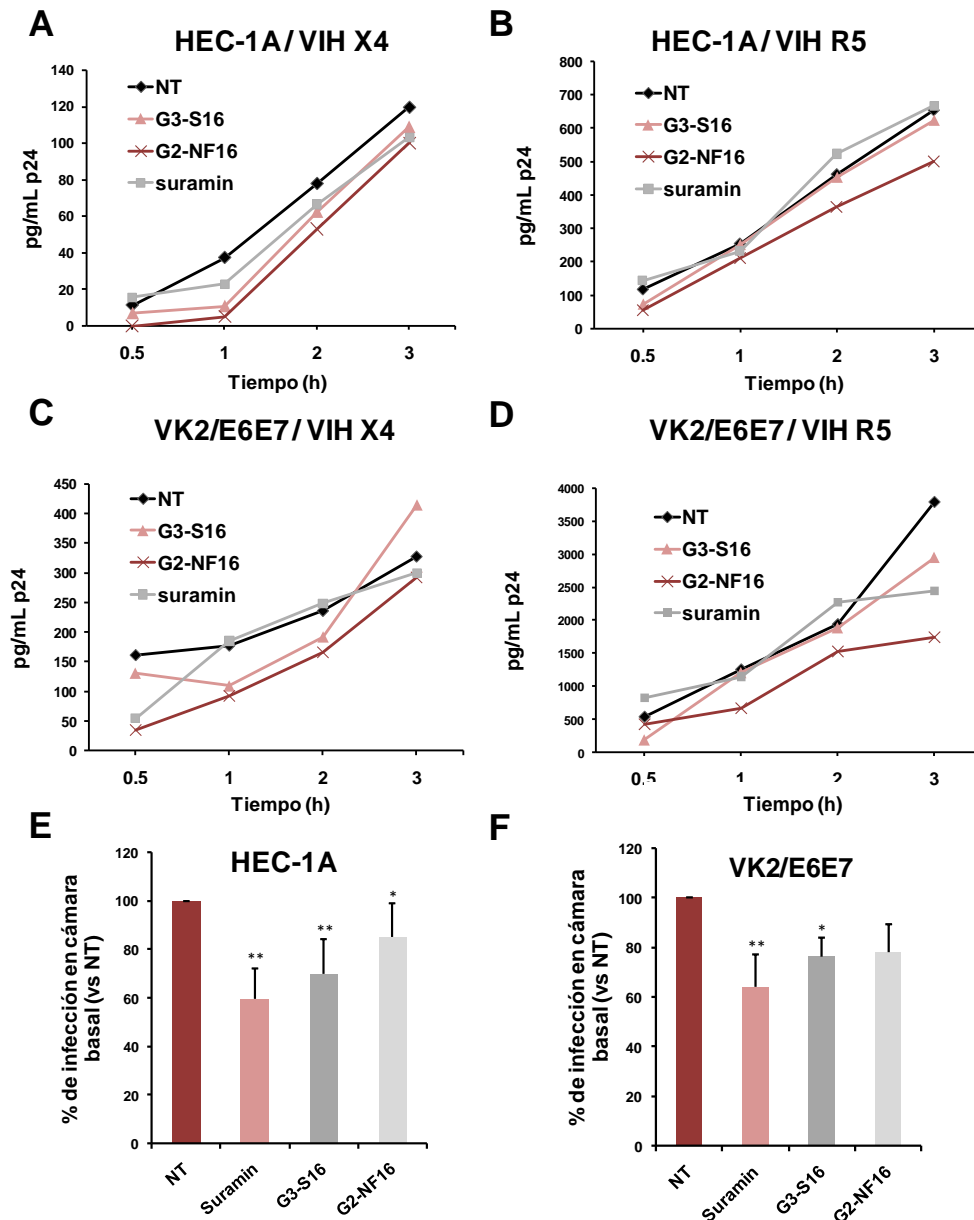


Figura 37. Reducción de la transmisión de partículas virales libres o de partículas de VIH asociado a células a través de una monocapa de células epiteliales en presencia de los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16. **(A)** Transmisión de partículas libres de X4 VIH-1_{NL 4.3} a través de una monocapa de células HEC-1A tratadas o no durante 1h con los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16 (5 μ M). El sobrenadante se recogió a diferentes tiempos de la cámara basal del sistema de transwell y se cuantificó la concentración viral por ELISA. **(B)** Transmisión de virus libre de tipo R5 VIH-1_{NL(AD8)} a través de una monocapa de HEC-1A. **(C)** Transmisión a través de una monocapa de VK2/E6E7 de partículas virales libres de X4 VIH-1_{NL 4.3} o de la cepa R5 VIH-1_{NL(AD8)} **(D).** **(E)** Transmisión de virus R5 VIH-1_{NL(AD8)} asociado a CMSP a través de una monocapa de HEC-1A. CMSP activadas fueron infectadas con 50ng de p24^{99g} del R5 VIH-1_{NL(AD8)} durante 2h, y luego añadidas a la cámara superior de un sistema de transwell, conteniendo una monocapa de HEC-1A pretratadas durante 1h con G3-S16 o G2-NF16 (5 μ M). Las CMSP activadas no infectadas de la cámara inferior fueron mantenidas en cultivo durante 7 días, midiéndose tras este tiempo la producción de antígeno p24^{99g} en el sobrenadante del cultivo por ELISA. **(F)** Transmisión del virus R5 VIH-1_{NL(AD8)} asociado a CMSP a través de una monocapa de VK2/E6E7 pretratadas con los dendrímeros. Se usó una concentración de G3-S16 y G2-NF16 de 3 μ M. Se usó 5 μ M de suramin como control positivo en todos los casos. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ vs control). Los datos se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 tienen un efecto protector frente a la acción disruptiva del VIH sobre monocapas epiteliales

En algunos estudios clínicos se ha demostrado como la infección por el VIH-1 está asociada a un incremento de la permeabilidad en el tracto intestinal²²⁴. Esto se debe a que el virus podría, de manera directa, romper las uniones estrechas intercelulares (*"tight-junctions"*), desestabilizando la integridad de la mucosa de la barrera epitelial y permitiendo la translocación viral y bacteriana. Debido a la capacidad de las células HEC-1A de establecer este tipo de interacciones, se midió la TEER de una monocapa de estas células durante 1h tras su pretratamiento o no con los compuestos G3-S16 y G2-NF16 (concentración de 5 μ M) y su infección con el aislado X4 VIH-1_{NL4.3} (Fig. 38). Tras 60min, mientras que el TEER de la monocapa infectada no tratada se había reducido en un 10% respecto de su valor inicial, no hubo cambios en la resistencia transepitelial de las monocapas infectadas que previamente habían sido tratadas con ambos dendrímeros, sugiriendo un efecto protector de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 sobre el epitelio urogenital y la ruptura de las *"tight junctions"* inducido por el VIH-1.

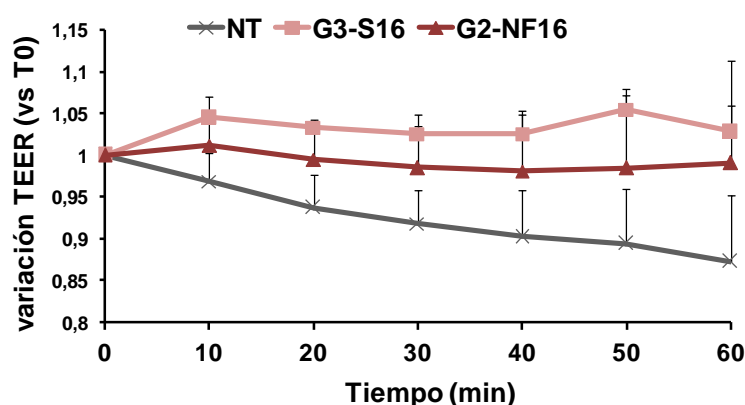


Figura 38. Variación de la resistencia transepitelial (TEER) de una monocapa de HEC-1A (en comparación con el tiempo inicial) después de su infección con X4 VIH-1_{NL4.3} (1 μ g de p24^{gag}), tras ser pretratada o no con los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16. Se realizó un seguimiento del TEER durante 1h post-infección. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

G3-S16 y G2-NF16 tienen actividad antiviral frente a aislados primarios y de laboratorio del VIH-1 en CMSP

Una vez que las partículas virales han atravesado la primera barrera que supone el epitelio genital, su principal diana son las CMSP activadas del torrente sanguíneo, especialmente las células CD4⁺. Por tanto, se estudió el efecto de los dendrímeros frente a la infección por VIH en este tipo de células. Las CMSP activadas fueron pretratadas durante 1h con distintas concentraciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 y después fueron infectadas con virus X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Se cuantificó la presencia de antígeno p24^{gag} en el sobrenadante del cultivo a las 72h. Los dendrímeros G3-SF16 y G2-NF16, a la concentración de 5 μ M, inhibieron de manera significativa la infección de CMSP activadas por parte de virus X4 y R5 (95% y 35% de inhibición para el G3-S16; 90% y 52% para el G2-NF16, respectivamente) (Fig. 39A). Además se evaluó la actividad antiviral

de ambos dendrímeros frente a varios aislados primarios de tipo R5 trópico pertenecientes a diferentes subtipos de pacientes VIH+, y se encontró un efecto inhibitorio diferente en función de cada subtipo viral (Fig. 39B). Los mejores resultados con el G3-S16 se obtuvieron frente a los subtipos C y G (80% y 88% de inhibición, respectivamente), y para el G2-NF16 frente a los subtipos F1 y AG (84% y 85% de reducción). Además, ambos dendrímeros mostraron una alta inhibición del subtipo viral R5 CRF02_AG, uno de los más prevalentes en el África Occidental²²⁵ (73% y 85% de inhibición para G3-SF16 y G2-NF16, respectivamente).

Debido a que los aislados de VIH-1 R5 trópicos son los predominantes durante la transmisión inicial del VIH, se estudió también el efecto de los dendrímeros frente a distintos aislados R5 usando la línea celular U87.CD4.CCR5. Las células se pretrataron con G3-S16 ó G2-NF16 y luego se infectaron con R5 VIH-1_{NL(AD8)}, R5 VIH-1_{WT/BAL} o el aislado dual R5/X4 VIH-1_{89.6}. A la concentración de 5µM ambos dendrímeros inhibieron de forma significativa la infección de las células U87.CD4.CCR5 por los distintos aislados R5 trópicos (Fig. 39C).

Por último, y para determinar la eficacia y el poder inhibitorio de estos dendrímeros, se estimó su EC₅₀ (concentración de compuesto a la que se consigue un 50% de reducción en la producción viral) en células TZM.bl. Ambos dendrímeros fueron más eficaces contra el aislado X4 VIH-1_{NL4.3} (G3-S16 EC₅₀=0,0493µM; G2-NF16 EC₅₀=0,0276µM) que frente al aislado R5 trópico VIH-1_{WT/BAL} (G3-S16 EC₅₀=1,22984µM; G2-NF16 EC₅₀=1,09449µM) (Fig. 40).

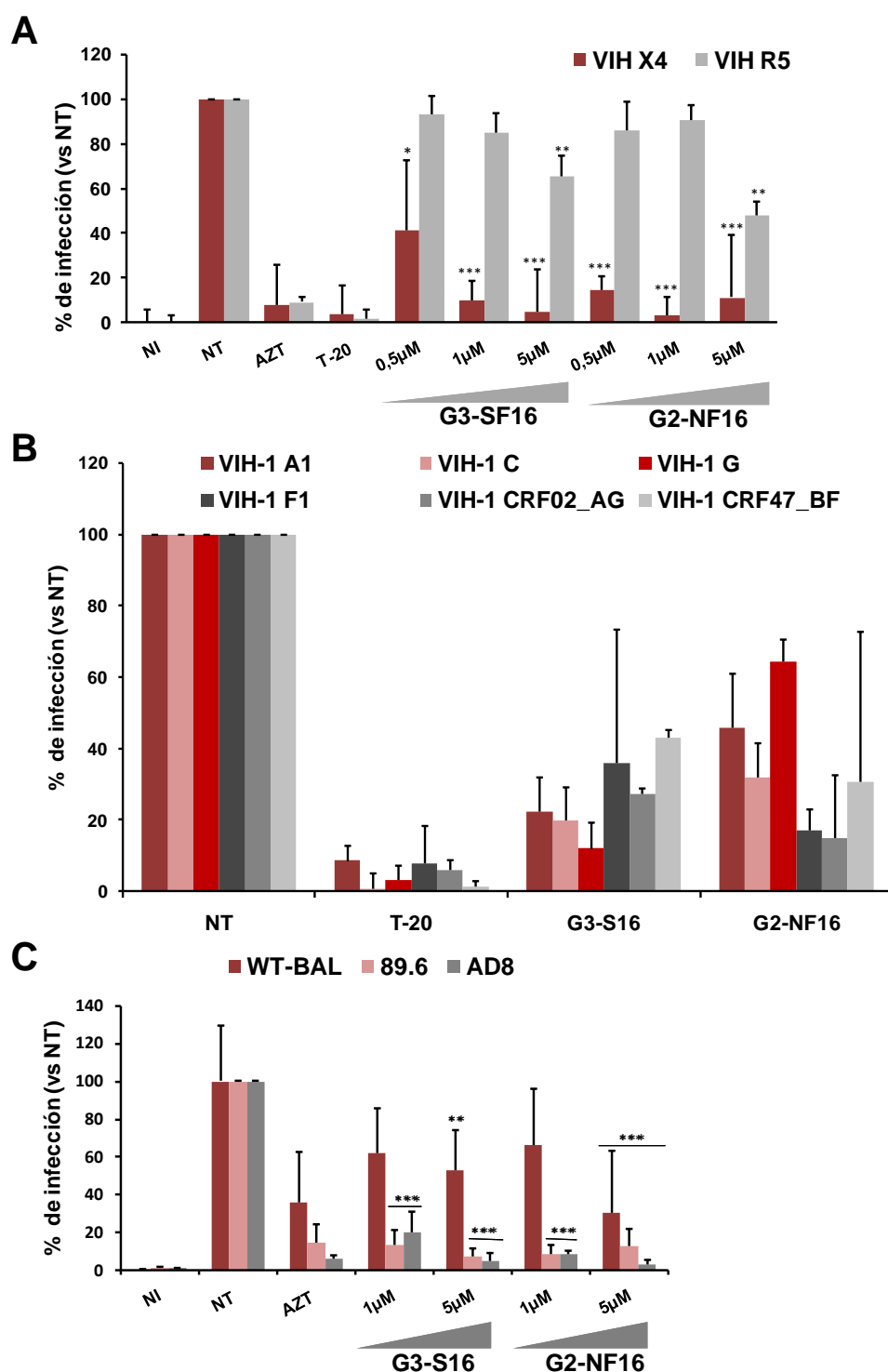


Figura 39. Actividad antiviral de G3-SF16 y G2-NF16. **(A)** Efecto antiviral de los dendrímeros en CMSP. Se trató a CMSP con concentraciones crecientes de G3-S16 y G2-NF16 durante 1h antes de su infección con las cepas de laboratorio X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron a los 3 días y se cuantificó el antígeno p24^{gag} por ELISA. AZT 10µM se usó como control positivo. **(B)** Efecto antiviral de G3-S16 y G2-NF16 en CMSP contra aislados clínicos primarios R5 trópicos de VIH-1. Se usaron concentraciones de 5µM de cada uno de los dendrímeros. T-20 20µM se empleó como control positivo. **(C)** Actividad antiviral frente a distintas cepas R5 y dual trópicas en la línea celular U87.CD4.CCR5. Se usó un rango de concentraciones de dendrímero de entre 1 y 5µM. Cada condición se estudió por triplicado. Los datos se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs control).

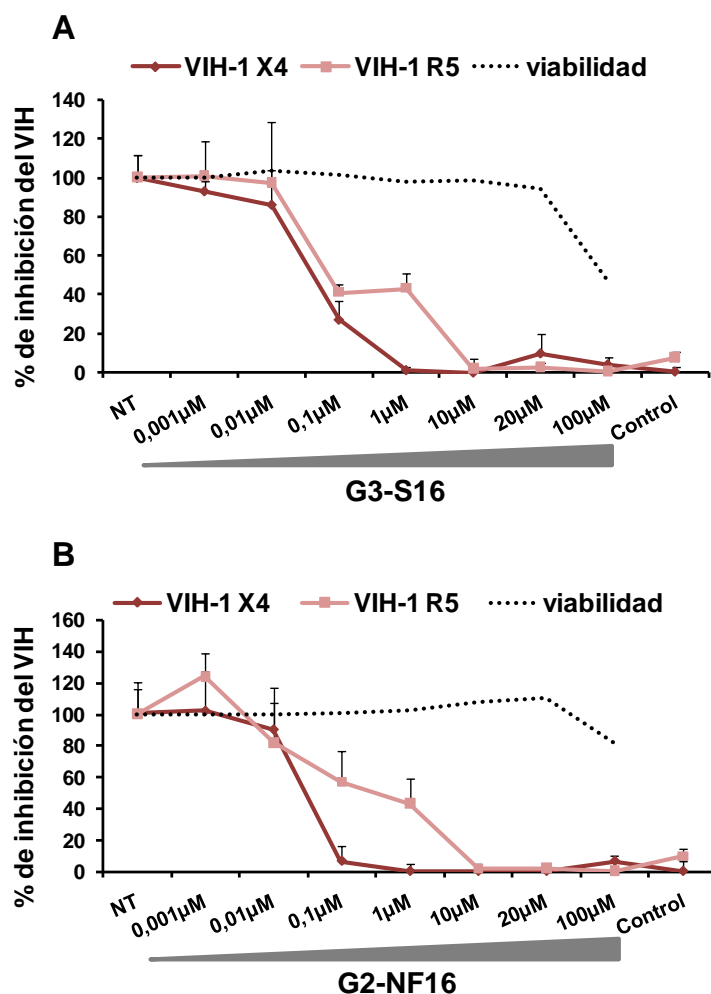


Figura 40. Curva de inhibición de la replicación de X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} por los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 en TZM.bl. Las células TZM.bl se trataron con concentraciones crecientes de G3-S16 (**A**) y G2-NF16 (**B**) 1h antes de su infección por el VIH-1. Tres días después se cuantificó la infección viral mediante la medida de los niveles de expresión de luciferasa. La citotoxicidad de estos compuestos se evaluó de forma paralela a su eficacia mediante un ensayo de MTS. Los valores de EC₅₀ se calcularon por regresión lineal usando el software de análisis CalcuSyn. Los datos se representan como la media ± SD de tres experimentos independientes.

G3-S16 y G2-NF16 no producen proliferación ni inflamación en células primarias y líneas células humanas

Una vez demostrado el potencial antiviral y microbicida de estos dendrímeros polianiónicos, se evaluó su seguridad a través del estudio de su capacidad de desregular la actividad de células primarias o líneas celulares epiteliales. Primeramente, se analizó si un pretratamiento de CMSP con G3-S16 ó G2-NF16 tendría algún efecto sobre su actividad proliferativa. Se usaron como control positivo de proliferación CMSP marcadas con CFSE y tratadas con PHA. La proliferación celular se determinó como la pérdida de la señal de CFSE a los 5 días post-tratamiento. Ninguna de las concentraciones ensayadas estimuló la proliferación de CMSP en comparación con las células no tratadas (Fig. 41A). Se investigó también si el pretratamiento de las CMSP a distintos tiempos con los dendrímeros o la intensidad del tratamiento con PHA afectaba a su capacidad de proliferación ante la aparición de un posterior estímulo proliferativo (Fig. 41B-C). No se encontraron diferencias de

proliferación cuando las CMSP fueron pretratadas con los dendrímeros durante 1, 4 ó 24h antes de su activación con 2µg/mL de PHA, a excepción del tratamiento con G2-NF16 a 5µM, donde se encontró una pequeña, pero significativa reducción de la proliferación. Tampoco se encontraron diferencias en la proliferación de las CMSP después de su estimulación con distintos tratamientos de PHA (0,25, 0,5, 1 ó 2µg/mL) tras 5 días post-tratamiento.

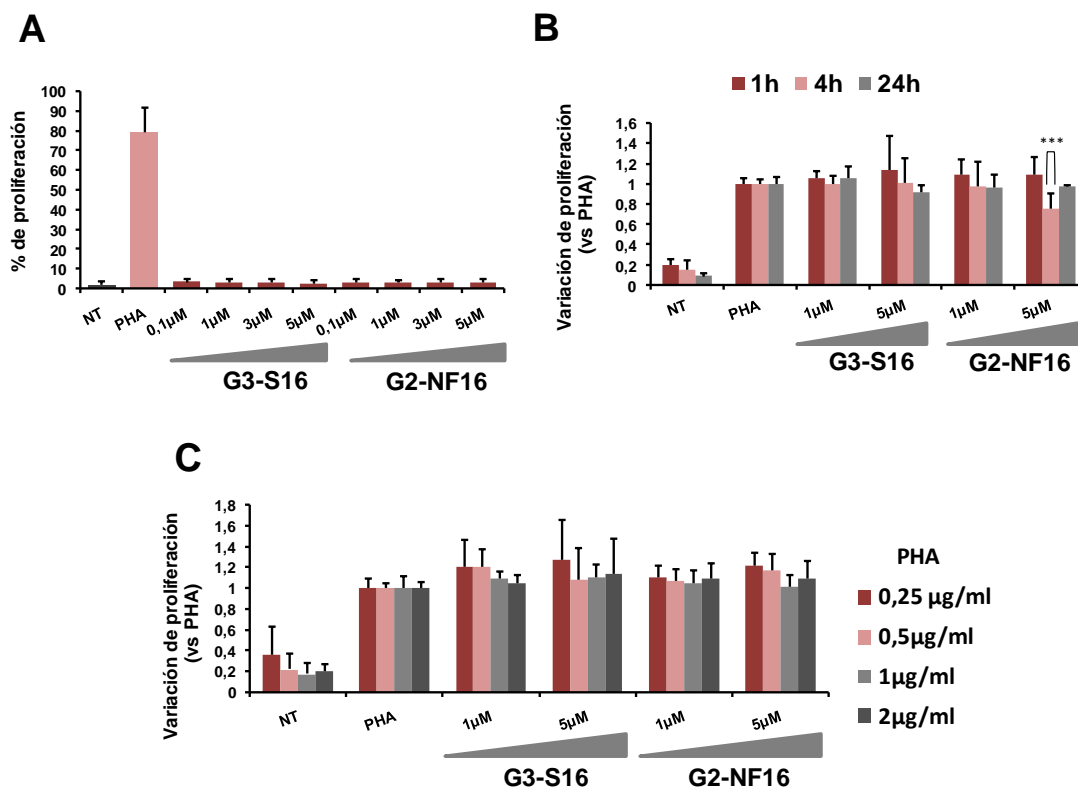


Figura 41. Efecto de G3-SF16 y G2-NF16 sobre la proliferación de CMSP. **(A)** Evaluación del efecto de los dendrímeros aniónicos sobre la inducción de la proliferación en CMSP. CMSP tratadas con PHA se usaron como control positivo de proliferación. La proliferación se midió como pérdida de la señal de CFSE a día 5. **(B)** Proliferación de CMSP tratadas con dendrímeros después de su estimulación con PHA a día 5. Las CMSP se pretrataron con G3-S16 ó G2-NF16 durante 1, 4 ó 24h previamente a su estimulación con 2µg/mL de PHA. **(C)** Efecto del tratamiento de CMSP con los dendrímeros sobre su activación con estímulos proliferativos de diferente intensidad. Se usó un rango de concentraciones de PHA de entre 0,25-2µg/mL para la activación de las CMSP. (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ vs control). Los datos se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Debido a que la principal diana de aplicación de un microbicida son las mucosas rectales y genitales, se consideró además estudiar el posible efecto inflamatorio de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 en células epiteliales. En una monocapa de células HEC-1A o VK2/E6E7 se evaluó el perfil de secreción de citoquinas proinflamatorias tras 30min, 1, 3 ó 24h de tratamiento con los dendrímeros (Tablas 3 y 4). No se encontraron diferencias en los valores de expresión de citoquinas de las células tratadas en comparación con las células no tratadas.

Estos resultados sugieren que G3-S16 y G2-NF16 no inducen *in vitro* proliferación celular ni procesos inflamatorios, propiedades esenciales para garantizar la seguridad de cualquier microbicida de uso tópico.

HEC-1A

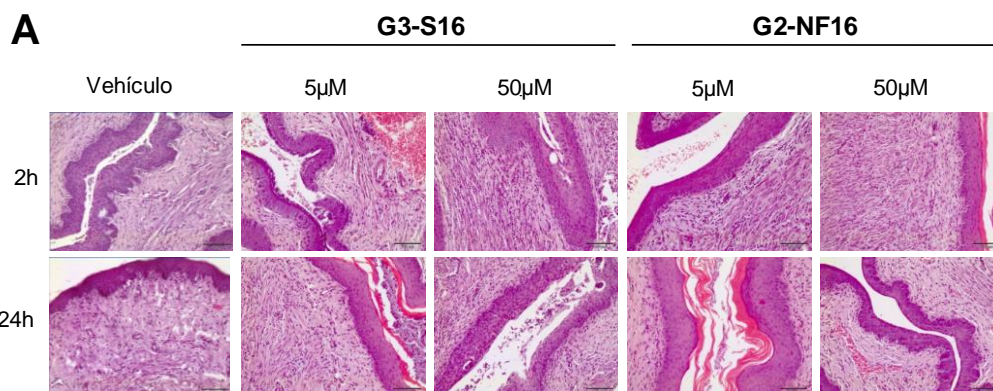
Citoquina	Condición	Tiempo (h)			
		0.5	1	3	24
IL12p70	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
TNF- α	Control	31,345	31,345	31,345	31,345
	G3-S16	31,345	31,345	31,345	31,345
	G2-NF16	31,345	31,345	31,345	31,345
IL-1 β	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-17A	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-4	Control	13,3075	13,3075	13,26	13,285
	G3-S16	13,2375	13,2375	13,2125	13,26
	G2-NF16	13,285	13,1675	13,2375	13,2825
IL-6	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-8	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-10	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-2	Control	8,055	8,1925	8,1425	8,545
	G3-S16	8,275	8,4025	8,3675	8,075
	G2-NF16	8,125	8,2275	8,5025	8,0975
IFN-g	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND

Tabla 3. Perfil de secreción de citoquinas por HEC-1A. Células HEC-1A fueron tratadas o no (condición control) con G3-S16 y G2-NF16 (5 μ M) durante los tiempos indicados. Los niveles de secreción de citoquinas se determinaron como pg/mL en el sobrenadante del cultivo por citometría de flujo. Los datos se representan como la media de dos experimentos. ND= no detectable

VK2/E6E7

Citoquina	Condición	Tiempo (h)			
		0.5	1	3	24
IL12p70	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
TNF- α	Control	31,345	31,345	31,345	31,345
	G3-S16	31,345	31,345	31,345	31,345
	G2-NF16	31,345	31,345	31,345	31,345
IL-1 β	Control	32,9775	27,18	27,595	27,455
	G3-S16	30,265	28,2925	25,1575	27,18
	G2-NF16	29,805	29,2325	24,09	22,3225
IL-17A	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-4	Control	14,0075	14,2675	14,1025	14,2175
	G3-S16	14,1025	14,0325	14,055	14,1025
	G2-NF16	13,845	14,01	14,1275	13,7975
IL-6	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND
IL-8	Control	1,0225	0,985	1,03	1,9575
	G3-S16	0,5025	0,6025	0,94	2,915
	G2-NF16	1,165	1,795	4,5775	3,28
IL-10	Control	220,08	199,13	211,5625	179,065
	G3-S16	177,5275	181,3625	170,14	165,115
	G2-NF16	179,7275	183,8775	179,065	154,7625
IL-2	Control	9,92	10,225	10,3675	10,8625
	G3-S16	8,415	8,51	8,315	8,27
	G2-NF16	8,08	8,0125	8,0775	7,9625
IFN-g	Control	ND	ND	ND	ND
	G3-S16	ND	ND	ND	ND
	G2-NF16	ND	ND	ND	ND

Tabla 4. Producción de citoquinas por las células VK2/E6E7. Células epiteliales VK2/E6E7 fueron tratadas con los dendrímeros carboxilanos G3-S16 y G2-NF16 (3 μ M) durante 0.5, 1, 3 ó 24h. La producción de citoquinas como pg/mL fue medida en los sobrenadantes del cultivo mediante citometría. Los datos se representan como la media de dos experimentos. ND= no detectable



B

Tratamiento 2h	Vehículo*	G3-S16 5µM*	G3-S16 50µM*	G2-NF16 5µM*	G2-NF16 50µM*
Lesión epitelial (0-4)**	0	0	0	0	0
Infiltración leucocitaria (0-4)**	1 ± 1.41	0	1 ± 1.41	1	1.5 ± 0.70
Congestión vascular (0-4)**	0.5 ± 0.70	1.5 ± 0.70	1	0.5 ± 0.70	0
Edema (0-4)**	0	0	0	0	0
Irritación microscópica ^Δ	1.5	1.5	2	1.5	1.5
Índice irritación vaginal (0-16)*	0	0	0.5	0	0

Tratamiento 24h	Vehículo*	G3-S16 5µM*	G3-S16 50µM*	G2-NF16 5µM*	G2-NF16 50µM*
Lesión epitelial (0-4)**	0	0	0	0	0
Infiltración leucocitaria (0-4)**	0	0.5 ± 0.70	0.5 ± 0.70	0.5 ± 0.70	0.5 ± 0.70
Congestión vascular (0-4)**	0	0	0	0.5 ± 0.70	0.5 ± 0.70
Edema (0-4)**	0	0	0	0	0
Irritación microscópica ^Δ	0	0.5	0.5	1	1
Índice irritación vaginal (0-16)*	0	0.5	0.5	1	1

Figura 42. Biocompatibilidad *in vivo* de los dendrímeros. **(A)** Tinciones de hematosilina-eosina de cortes histológicos de vaginas de ratones CD1(ICR) tratados vaginalmente durante 2 ó 24h con diferentes concentraciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16. **(B)** Índices de irritación vaginal en estos mismos ratones tras su tratamiento con G3-S16 y G2-NF16. Vehículo representa PBS.

*Media ± SD

** Los valores fueron calculados como la media de las puntuaciones de las vaginas analizadas en cada grupo. En los ensayos de irritación e hipersensibilidad se usó un sistema de evaluación gradual para el examen microscópico del tejido vaginal (ISO 10993-10) con puntuaciones desde 0 (parámetros normales o ausencia de efectos adversos) a 4 (efectos adversos graves). La puntuación final viene expresada como media ± SD de las distintas muestras analizadas.

Δ El valor de irritación microscópica corresponde a la adición de las puntuaciones de los distintos parámetros evaluados: irritación epitelial, infiltración leucocitaria, congestión vascular y edema, en concordancia con lo establecido en los estándares de la Norma ISO 10993.

• La media obtenida en el grupo control (vehículo) se restó a las diferentes condiciones evaluadas para la determinación de los índices de irritación vaginal. La correlación establecida con su equivalente en humanos es la siguiente: Índice de irritación vaginal < 8: Aceptable; 9–10: Marginal; y ≥ 11: Inaceptable.

Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 no producen irritación ni inflamación *in vivo*

Se realizó un ensayo con ratones hembra de la cepa CD1(ICR) para determinar si la administración tópica de los dendrímeros podría causar irritación vaginal^{226,227}. Las ratonas fueron tratadas vaginalmente con distintas soluciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 durante 2 y

24h para evaluar posteriormente la aparición de irritación vaginal, así como otros parámetros asociados a lesiones epiteliales en la zona. Cuando las ratonas fueron tratadas con ambas concentraciones (5µM y 50µM) de cualquiera de los dos dendrímeros, no se encontró toxicidad, síntomas de irritación, edema o lesión en sus vaginas en comparación con las de las ratonas tratadas con vehículo (Fig. 42). Tampoco se detectaron características anormales en el estudio anatómo-histopatológico realizado a las vaginas. El índice de irritación vaginal se calculó a partir de las puntuaciones determinadas en la observación microscópica de los tejidos, y valores de 0,5 y 1 para las dosis más altas de G3-S16 y G2-NF16 a las 24h confirmaron la seguridad y biocompatibilidad de ambos compuestos. Por tanto, se puede concluir que estos dendrímeros no inducen irritación vaginal o inflamación, por lo que son buenos candidatos para su aplicación vía tópica.

G3-S16 y G2-NF16 no afectan a la flora vaginal habitual ni tienen efecto sobre la supervivencia y motilidad espermática

Un factor importante en el desarrollo y búsqueda de nuevos microbicidas a la hora de ratificar su total biocompatibilidad y seguridad es la evaluación de su efecto y toxicidad sobre el espermatozoides masculino y la flora vaginal normal⁹³. Se estudió la toxicidad de estos compuestos en distintos microorganismos encontrados habitualmente en la flora vaginal como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Candida albicans*. No se observó una actividad antimicrobiana de los dendrímeros contra estos microorganismos a las concentraciones estudiadas.

Además, se realizó un ensayo para evaluar la actividad de los dendrímeros sobre la supervivencia espermática. Espermatozoides de distintos donantes se cultivaron en presencia o ausencia de G3-S16 y G2-NF16, midiéndose su movilidad progresiva (MP). No se encontraron cambios en el índice de supervivencia espermática, calculado a partir del cambio en la MP en comparación con la condición control, tras 24h de tratamiento (Tabla 5). Por tanto, estos datos confirman la seguridad de estos dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano para su uso como microbicidas de uso vaginal.

Tratamiento	Índice supervivencia espermática
Control	100 ± 0.00
G3-S16 1µM	92.50 ± 2.12
G3-S16 5µM	86.00 ± 8.49
G2-NF16 1µM	83.50 ± 0.71
G2-NF16 5µM	86.00 ± 0.00
Mix 1µM	86.00 ± 7.07
Mix 5µM	90.00 ± 5.66

Tabla 5. Índice de supervivencia espermática tras 24h de tratamiento con G3-S16 y G2-NF16. Los espermatozoides se cultivaron en plasma seminal en presencia o ausencia de distintas concentraciones de los G3-S16 y G2-NF 16, así como en una mezcla de ambos. La movilidad progresiva de los espermatozoides se midió usando el equipo Sperm Quality Analyser IIB. Un índice de movilidad espermática <0.75 se estableció como el límite de toxicidad de los dendrímeros. Los datos representan la media ± SD de dos donantes diferentes.

La actividad antiviral de G3-S16 y G2-NF16 se mantiene en distintos pH y en presencia de plasma seminal

Otro punto crítico en el desarrollo de estos dendrímeros como agentes microbicidas es la evaluación de su estabilidad y actividad biológica durante los críticos cambios de pH que ocurren en la vagina tras la eyaculación masculina⁹². Este acontecimiento puede ocasionar fluctuaciones en el pH vaginal que van desde 4,5 hasta 7,0. Para estudiar este efecto del pH vaginal y el semen en la actividad anti-VIH de los dendrímeros, estos compuestos se incubaron durante 1h con diferentes soluciones con pH entre 3 y 7 y con plasmas seminales humanos para mimetizar los efectos que ocasiona el semen en la vagina. Posteriormente, se utilizó a estos dendrímeros para el pretratamiento de células TZM.bl antes de su infección con las cepas virales X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)}. La infección viral se determinó a las 48h post-infección.

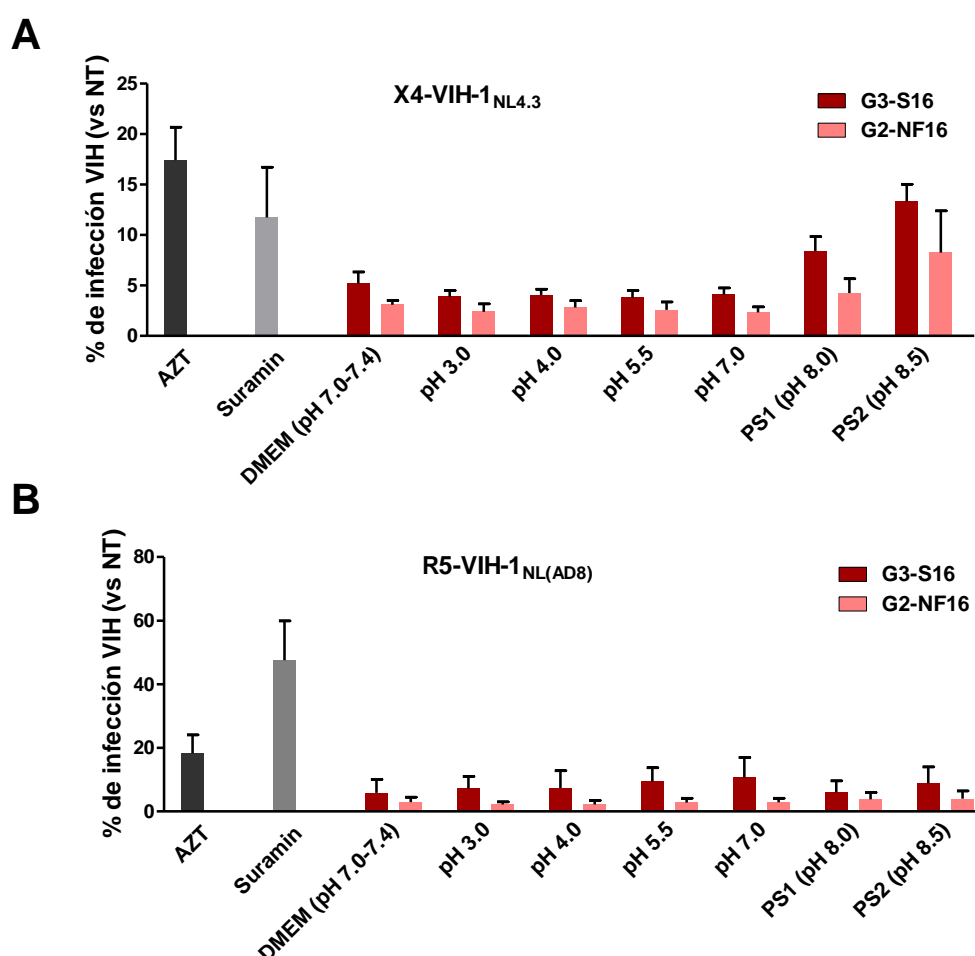


Figura 43. Efecto del pH y el plasma seminal sobre la actividad anti-VIH de los dendrímeros. Los dendrímeros testados fueron incubados con soluciones a diferentes pH o en plasma seminal durante 1h. Posteriormente, células TZM.bl fueron pretratadas 1h con estos dendrímeros e infectadas con X4 VIH-1_{NL4.3} (A) o R5 VIH-1_{NL(AD8)} (B). La infección viral, medida como actividad luciferasa, se determinó a las 48 post-infección. Los cambios en la infección se expresaron como % de infección (en comparación con la actividad luciferasa de las células infectadas no tratadas). Suramin 5μM y AZT 10μM se usaron como controles positivos de inhibición de la infección. PS (seminal plasma). Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos se representan como la media ± SD de dos experimentos independientes.

Cuando las células se trataron con los dendrímeros incubados a los diferentes pH, se encontró alrededor de un 95% de inhibición del aislado X4 VIH-1_{NL4.3} (Fig. 43A), y no se observaron diferencias en los valores de inhibición cuando los dendrímeros se incubaron a pH fisiológico de 7 o a pH ácidos. Además, ambos dendrímeros inhibieron fuertemente la infección del aislado X4 VIH-1_{NL4.3} cuando se incubaron en presencia de los distintos plasmas seminales (85-90% de inhibición), que presentan un pH básico de alrededor de 8-8,5. Tampoco se encontraron diferencias en los valores de inhibición de los dendrímeros, en comparación con el control, cuando éstos se incubaron a distintos pH o en plasma seminal en el caso de la infección con el aislado R5 trópico VIH-1_{NL(AD8)} (Fig. 43B). En todas las condiciones probadas, ambos dendrímeros inhibieron la infección viral en valores de en torno al 90-95%, por lo que, resumiendo, los cambios de pH no alteran la actividad antiviral de los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16.

Especificidad antiviral de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16

Como se ha demostrado anteriormente, los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 tienen una alta actividad frente a la infección por el VIH-1. Sin embargo, se evaluó si presentaban también actividad frente a otros tipos virales, ya que una característica deseable y clave en cualquier microbicida es un amplio espectro de acción que evite la transmisión de diferentes ETS. Se estudió si existían diferencias en la actividad antiviral de los dendrímeros, previniendo la infección en CMSP, en el caso de la infección con dos lentivirus de distinta envuelta: env-X4-luc o env-VSVG-luc-VIH. Ambos dendrímeros no inhibieron eficazmente la infección del lentivirus env-VSVG-luc-VIH, pero sí la del env-X4-luc-VIH, lo que sugiere una cierta especificidad de acción dependiente de las características de la envuelta viral (Fig. 44A). Además, el uso de estos virus no replicativos, indican que los dendrímeros ejercen su papel inhibidor de la infección en un paso previo a la integración viral. El mecanismo de acción de los dendrímeros será estudiado más en profundidad en la siguiente sección de esta Memoria.

Sin embargo, G3-S16 y G2-NF16 sí que mostraron una cierta eficacia en la inhibición de la infección de células Vero por el VHS-2, siendo este virus un importante co-factor en la transmisión del VIH (Fig. 44B). Cuando las células Vero se trataron con concentraciones no tóxicas de los distintos dendrímeros, se observó alrededor de un 50% de disminución en sus niveles de infección. Por tanto, podemos concluir que los dendrímeros carbosilanos tienen actividad frente a distintos tipos de virus de ARN y ADN con envuelta, tales como el VIH-1 o el VHS-2, respectivamente, aunque sí que existe una cierta especificidad de envuelta, ya que no son eficaces previniendo la infección en el caso del lentivirus env-VSVG-VIH, que posee la envuelta del virus VSV.

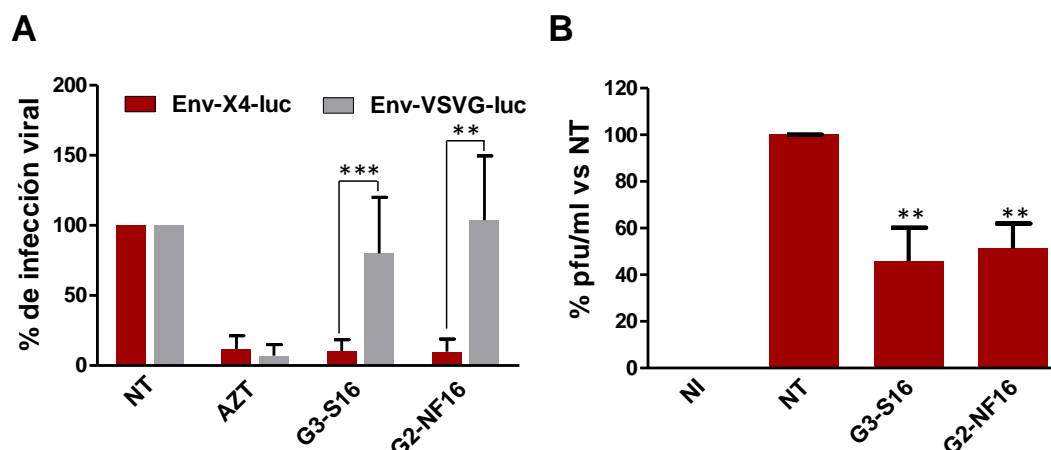


Figura 44. Especificidad de la actividad antiviral de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16. **(A)** CMSP activadas fueron tratadas durante 1h con concentraciones no tóxicas de los dendrímeros y luego infectadas toda la noche con los lentivirus env-X4-luc y env-VSVG-luc VIH. A los 2 días post-infección, se cuantificó la infección viral mediante la medida de los niveles de expresión de luciferasa. Se usó AZT como control positivo de inhibición. **(B)** Inhibición de la infección por VHS-2 *in vitro* por los dendrímeros carbosilanos. Células Vero fueron pretratadas o no con G3-S16 o G2-NF16 durante 1h de manera previa a la infección con VHS-2. Se cuantificó el número de placas virales para determinar de forma directa la actividad antiviral de los compuestos. (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. control). Los datos se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes

B. Estudio del mecanismo de acción de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16

Una vez determinado el potencial microbicida y la bioseguridad, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los dos dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16, se estudió su mecanismo de acción. Los compuestos polianiónicos se consideran, de forma general, como agentes antivirales no específicos que ejercen su acción a nivel de la entrada viral. Mediante modelaje molecular se ha hipotetizado sobre el mecanismo de acción de otros dendrímeros aniónicos carbosilanos como el 2G-S16, encontrando un posible papel en la inhibición de la entrada. Este dendrímero podría interaccionar electrostáticamente con zonas cargadas positivamente de la región V3 de la gp120 viral, impidiendo su interacción con el receptor CD4 de la célula diana, y bloqueando así la adhesión y entrada del VIH.

Sin embargo, el mecanismo concreto de acción de estos dendrímeros aún no ha sido dilucidado. Por ello, se ha investigado el modo de actuación de estos compuestos con el fin de arrojar luz y esclarecer los mecanismos a través de los cuales desarrollan su acción antiviral.

G3-S16 y G2-NF16 actúan en los primeros pasos del ciclo viral

Para intentar determinar el momento del ciclo viral en el cual actúan estos dendrímeros, se realizó un experimento en el que G3-S16 o G2-NF16 se añadieron a células infectadas a distintos tiempos pre y post-infección. Los dendrímeros únicamente fueron eficaces cuando se añadieron en pretratamiento o durante las primeras horas post-infección, en comparación con otros ARV habitualmente usados en clínica y dirigidos frente a distintas etapas del ciclo viral, lo que sugiere un

papel de los mismos en los primeros pasos del ciclo viral (Fig. 45). Además, el perfil inhibitorio de los dendrímeros es muy similar al observado para el T-20, un inhibidor de la fusión. Ello permite hipotetizar sobre una posible actividad de los dendrímeros en etapas previas a la infección o a nivel de la entrada.

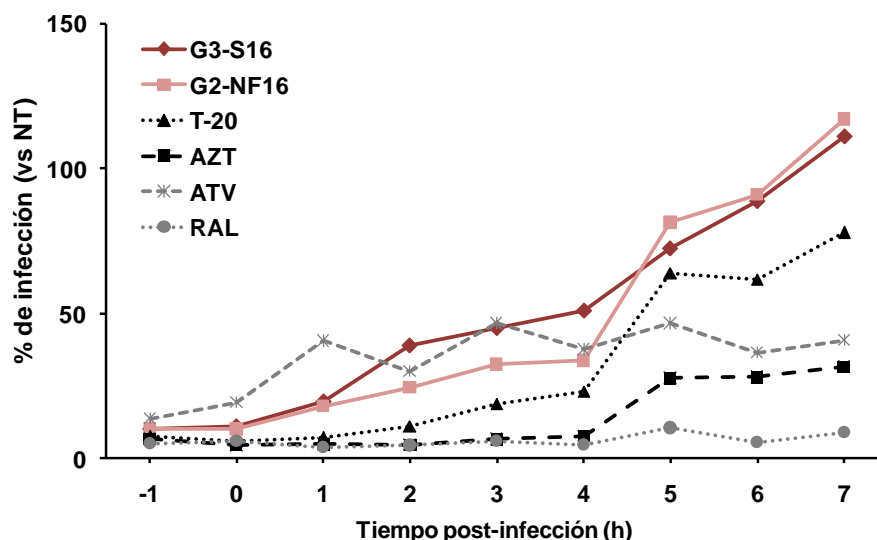


Figura 45. Efecto sobre la infección por VIH-1 de la adición a distintos tiempos de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16. Células TZM.bl fueron infectadas con X4 VIH-1_{NL4.3} y tratadas con los diferentes compuestos a distintos tiempos pre y post-infección. La infección viral, medida como actividad luciferasa, se determinó a las 30h post-infección y se expresó como % de infección (vs. actividad luciferasa en células infectadas no tratadas). T-20 (enfuvirtide, 20 μ M), AZT (zidovudina, 10 μ M), ATV (atazanavir, 0,1 μ M), RAL (raltegravir, 1 μ M) y una concentración no tóxica de 5 μ M de G3-S16 y G2-NF16 fueron usados como agentes antivirales. Los datos se representan como la media de tres experimentos independientes

En base a estos datos, y para determinar más en profundidad el mecanismo de los dendrímeros, se evaluó su efecto sobre la unión y la internalización del VIH en CMSP. La adsorción de partículas virales de VIH-1 tipo X4 y R5 en CMSP se redujo en un 56% y 38%, respectivamente, por el dendrímero G3-S16 a la concentración de 5 μ M (Fig. 46A). Para el dendrímero G2-NF16, a su concentración más alta, se obtuvieron reducciones de la unión del virus a la célula diana del 62% y 40% para los virus X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} en comparación con las células no tratadas (Fig. 46A). En el caso de la internalización, sólo el dendrímero G2-NF16 redujo significativamente (81% a la concentración de 5 μ M) la entrada de partículas de X4 VIH-1_{NL4.3} en CMSP (Fig. 46B). Sin embargo, no hubo una reducción significativa de la internalización cuando las células se pretrataron con G3-S16 (54% y 19% para X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)}, respectivamente, a la concentración de 5 μ M) o con G2-NF16 (27% de reducción para el R5 VIH-1_{NL(AD8)}).

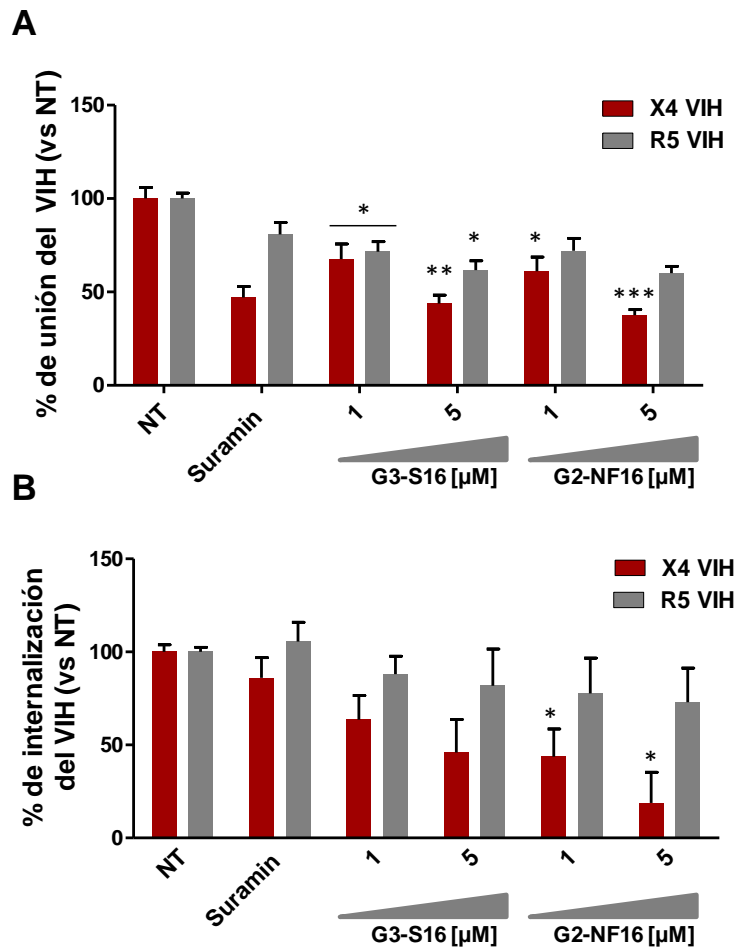


Figura 46. Efecto de los dendrímeros aniónicos carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 sobre la unión (A) e internalización (B) del VIH en CMSP. CMSP activadas se trataron 1h con los dendrímeros antes de su infección con X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} durante 3h a 4°C ó 37°C (para el ensayo de unión e internalización, respectivamente). Las células posteriormente se lavaron y lisaron con 0,1% Triton X-100. La cantidad de antígeno p24^{gag} fue cuantificada por ELISA. Suramin se usó como control positivo. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. control). Los datos se representan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes

A pesar de que los dendrímeros no son capaces de impedir totalmente la entrada de partículas virales en el interior de las células diana, sobre todo en el caso del aislado R5, el mecanismo de infección de este tipo viral está fuertemente inhibido (con una media de 80-95% de inhibición según los aislados estudiados, ver Fig. 39), lo que incita a pensar en que la entrada no es la única diana sobre la que estos dendrímeros actúan.

G3-S16 y G2-NF16 son capaces de inhibir la fusión de membranas mediada por la interacción Env/CD4

Se realizó un ensayo de fusión celular, tratando de mimetizar el proceso de fusión de membranas que ocurre entre la envuelta viral y la membrana de la célula diana mediado por el reconocimiento entre la proteína gp120 del virus y el receptor CD4 de la célula susceptible de infección. Para ello, se emplearon células de la línea 8E5, que expresan la proteína viral Env en su superficie y la proteína Tat en su citoplasma (células efectoras) y células HeLa-MAGI CD4+ (células reporteras). Estas células pueden fusionar sus membranas como resultado de la interacción gp120-

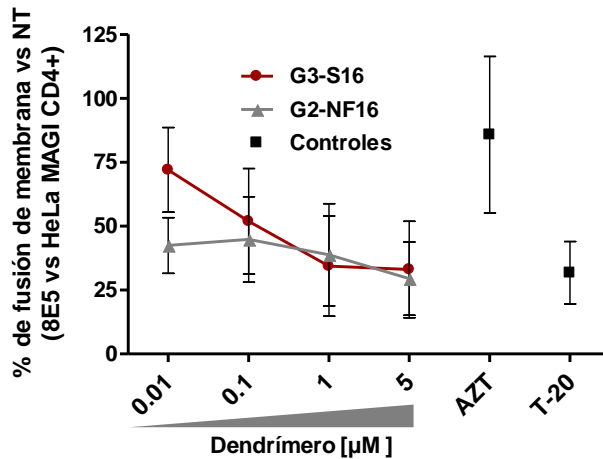
CD4. Los niveles de fusión celular se determinaron de manera indirecta mediante la medida de la expresión del gen reportero β -gal en las células HeLa. Cuando se pretrató el co-cultivo de células 8E5-HeLa con una concentración $5\mu\text{M}$ de los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 se observó un 70% de inhibición de la fusión (Fig. 47A). Ambos dendrímeros fueron capaces de bloquear la fusión entre ambos tipos celulares de una manera concentración dependiente. El AZT, un inhibidor de la transcriptasa reversa utilizado como control, no ejerció ningún efecto inhibitorio sobre la fusión de membranas. Sin embargo, el T-20, que como ya se mencionó anteriormente es un inhibidor de la fusión, sí que inhibió la fusión en unos valores similares a los de los dendrímeros.

Para confirmar que la inhibición de la fusión observada se debía al papel inhibidor de los dendrímeros carbosilanos sobre la interacción gp120/CD4, se realizó un ensayo de captura por ELISA de gp120 sobre una placa recubierta de CD4 en presencia o ausencia de G3-S16 y G2-NF16. Cuando la gp120 se pretrató con distintas concentraciones de los dendrímeros se encontraron reducciones de entre un 63-92% en la unión de gp120 a CD4 (Fig. 47B). Sin embargo, no se observó un efecto concentración dependiente, y ya a las dosis más bajas de los dendrímeros, éstos fueron muy efectivos bloqueando la interacción (92% y 74% de inhibición para las concentraciones de $0,1\mu\text{M}$ de G3-S16 y G2-NF16, respectivamente). No se observó un descenso de la interacción gp120/CD4 cuando la proteína gp120 fue pretratada con el control T-20. Esto se debe a que la diana de unión de este compuesto no es la gp120 viral, sino la gp41²²⁸.

Los dendrímeros carbosilanos polianiónicos G3-S16 y G2-NF16 son capaces de inactivar a las partículas del VIH

Una vez encontrado el más que presumible papel de los dendrímeros en las etapas de adsorción, fusión y entrada viral, se analizó si estos dendrímeros ejercían su acción a nivel del virus o a nivel de la célula diana. En primer lugar se estudió el posible efecto de los dendrímeros a nivel de la partícula viral. Para ello se analizó la capacidad de los dendrímeros de interaccionar con la superficie del virus y bloquear su capacidad infectiva. Cuando las partículas virales se pretrataron con los dendrímeros y luego se pusieron en contacto con CMSP, se observó una acusada reducción de la infección (Fig. 48). Esta reducción fue de alrededor de un 95% en el caso del aislado X4 VIH-1_{NL4.3}, cuando éste fue tratado con ambos dendrímeros. En el caso del pretratamiento del virus R5, el efecto fue el mismo. Cuando se trató a partículas del R5 VIH-1_{NL(AD8)} con los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16 se obtuvo una disminución de la infección viral del 92% y 85%, respectivamente, en comparación con los virus no tratados. Este efecto inhibitorio es comparable al del tritón X-100, compuesto usado como control capaz de lisar al virus. Por tanto, ambos dendrímeros son capaces de bloquear e inactivar directamente al VIH-1, tanto en el caso de los aislados X4 como de los aislados R5.

A



B

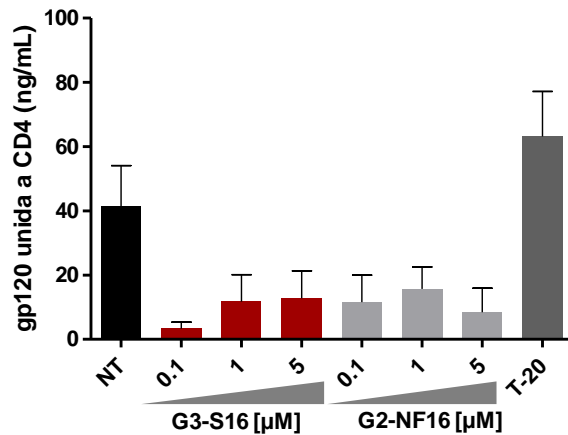
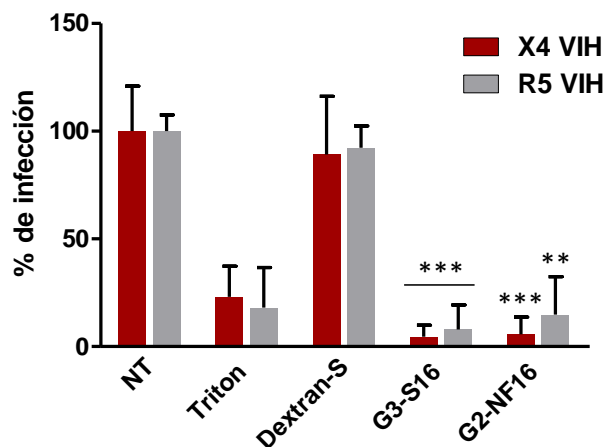


Figura 47. Inhibición de la interacción gp120-CD4. **(A)** Un ensayo de fusión celular fue realizado para simular la fusión que ocurre entre las proteínas gp120-CD4 de las membranas del virus y de la célula hospedadora. Células 8E5 y HeLa MAGI-CD4+ fueron incubadas con distintas concentraciones de dendrímeros carboxilanos o con los ARV controles (AZT y T-20). El porcentaje de fusión de membranas entre 8E5-HeLa MAGI se calculó como actividad β-gal en las células HeLa respecto al control positivo de células no tratadas. Este experimento se realizó por triplicado y los datos representan la media ± SD de tres experimentos independientes. **(B)** El grado de inhibición de la interacción gp120-CD4 se evaluó también mediante un ensayo de captura por ELISA gp120/CD4 en presencia o ausencia de los dendrímeros. La proteína gp120 fue pretratada durante 30min con concentraciones crecientes de G3-S16 y G2-NF16 y posteriormente incubada sobre una placa cubierta por CD4. Los datos muestran la media ± SEM de dos experimentos independientes. Cada condición se estudió por duplicado.

Figura 48. Inactivación del VIH-1 por G3-S16 y G2-NF16. Partículas de X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} se pegaron a una placa cubierta de poli-L-lisina y se trataron con una concentración 5μM de los dendrímeros; dextran-S (5 μM) o Triton X-100 (1%) durante 1h antes de su incubación con CMSP activadas. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron a los 3 días post-infección y se cuantificó el antígeno p24^{gag} por ELISA. (*: p< 0,01, ***: p< 0,001 vs. control). Los datos se representan como la media ± SD de tres experimentos independientes.



G3-S16 y G2-NF16 también son capaces de interactuar inespecíficamente con distintas moléculas y marcadores de superficie de células diana de la infección

Debido a su naturaleza cargada es probable que los dendrímeros no sólo actúen a nivel del virus, sino también a nivel celular. Por eso se estudió la capacidad de estos dendrímeros de interactuar con distintas proteínas de la membrana de las células diana implicadas en los primeros pasos del proceso de infección, como CD4, CXCR4 ó CCR5. CMSP se pretrataron con G3-S16 o G2-NF16 y posteriormente se incubaron con anticuerpos anti-CD4, anti-CXCR4 o anti-CCR5. Se evaluó los valores de estos marcadores de superficie por citometría (Fig. 49).

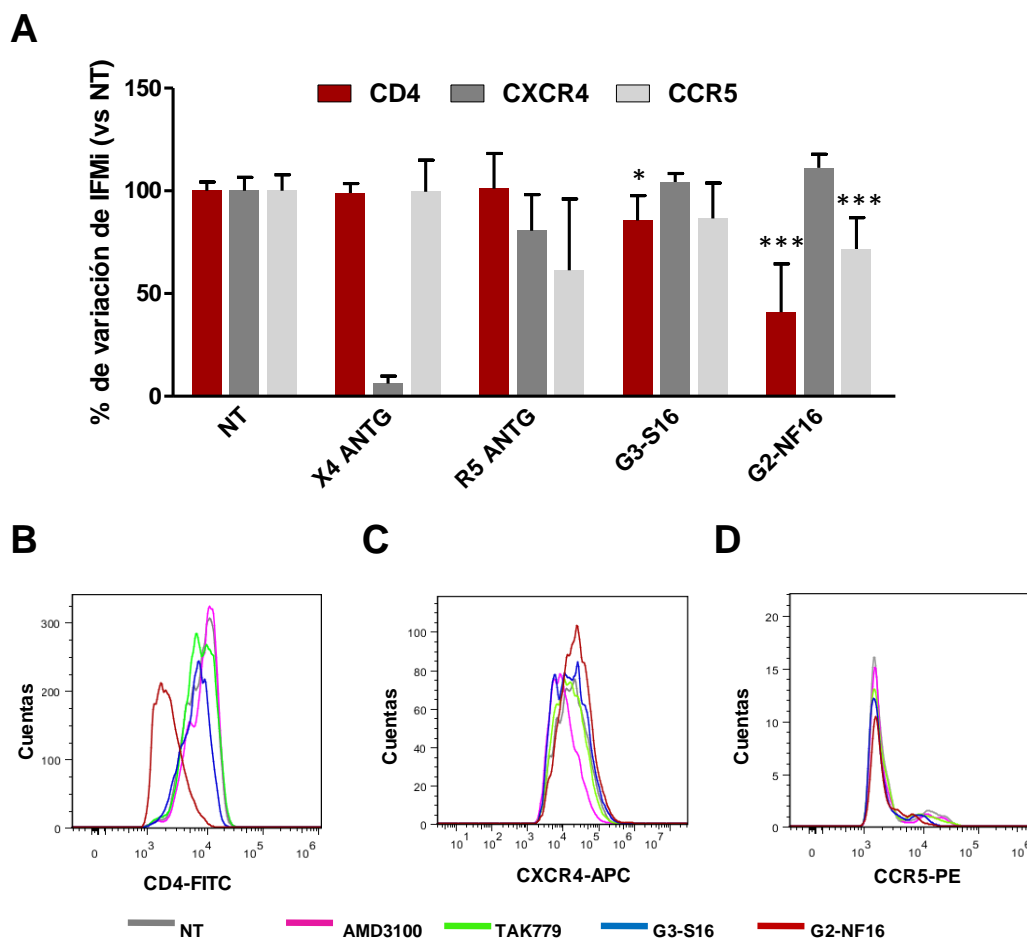


Figura 49. Interacción de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 con marcadores de la superficie celular. **(A)** CMSP activadas fueron tratadas con G3-S16 o G2-NF16 (5µM) durante 15min, evaluándose posteriormente los niveles de los receptores de superficie CD4, CXCR4 y CCR5 mediante citometría de flujo. Se muestran los ratios de la IFM integrada (IFMi) para cada marcador en comparación con los niveles en las células no tratadas (IFMi = % de células positivas x IFM del marcador). Controles: X4 ANTG= AMD3100, antagonista de CXCR4; R5 ANTG= TAK779, antagonista de CCR5. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. control). Los datos se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Histogramas procedentes del análisis por FACS de CMSP tratadas con los dendrímeros y marcadas con anticuerpos anti-CD4 **(B)**, anti-CXCR4 **(C)** o anti-CCR5 **(D)**. Se muestra un experimento representativo de los tres.

Cuando las células se trataron con G3-S16 y G2-NF16 se obtuvieron reducciones del 14% y 59%, respectivamente, en la IFMi del receptor CD4 (Fig. 49A-B), en comparación con las células no tratadas. En el caso del tratamiento con G2-NF16, se observó también una disminución del 28% en el IFMi del co-receptor CCR5 (Fig. 49A-D). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de IFMi del co-receptor CXCR4 (Fig. 49A-C). En función de estos resultados se puede concluir que los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 son capaces de unirse a distintas proteínas de la superficie celular como CD4 o CCR5, participando así en el bloqueo de algunos de los primeros pasos de la infección viral, como la fusión o la entrada.

G3-S16 y G2-NF16 impiden la transmisión viral célula-célula

No solo las partículas virales libres, sino también las células infectadas presentes en fluidos corporales, como el semen, están en gran medida implicadas en la primo-infección del VIH por vía sexual.

Previamente se ha mostrado como el tratamiento de monocapas de células epiteliales HEC-1A y VK2/E6E7 con los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 produce una disminución en la transmisión del virus asociado a células, medido como una disminución en la infección de CMSP en la cámara basal del sistema de transwell. Esta disminución en la infección puede deberse a un menor paso de células transportadoras de virus a través de la monocapa o a una menor transmisión del virus desde estas células a las células epiteliales, y desde éstas a las CMSP de la cámara inferior. Para tratar de resolver este asunto, primeramente se evaluó la capacidad de los dendrímeros de disminuir el paso de células infectadas (transmigración) a través de una monocapa de células epiteliales. Células infectadas se marcaron con CFSE y se colocaron en la cámara superior del sistema de transwell, analizándose por citometría su paso a la cámara inferior. No se encontraron diferencias en la transmigración de las células a través de estas monocapas cuando éstas estaban tratadas o no con los dendrímeros, descartando así un efecto de los dendrímeros en el paso celular (Fig. 50).

Esto sugiere un posible papel de los dendrímeros sobre el paso del virus entre células. Por ello se investigó la habilidad de los dendrímeros para impedir la transmisión del VIH desde células donadoras infectadas con el X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} a células diana no infectadas. Debido a que las CD son uno de los primeros tipos celulares en contactar con el VIH durante su transmisión sexual y a su implicación en la propagación viral hasta las células CD4⁺ en el tejido linfático, se analizó si los dendrímeros podrían impedir la transmisión viral célula-célula usando CD derivadas de monocitos como células donadoras y la línea reportera TZM.bl como células diana. (Fig. 51A-B). En el caso de las CD infectadas con X4 VIH-1_{NL4.3}, se detectaron reducciones en la transmisión viral, medida como expresión de luciferasa en las células diana, de un 80% tras el tratamiento con ambos dendrímeros, mientras que cuando se trataron las CD infectadas con R5 VIH-1_{NL(AD8)} los valores de reducción fueron de un 27% y 17% (para G3-S16 y G2-NF16, respectivamente) (Fig. 51A). Pero no sólo se estudió el tratamiento de las células donadoras. También se evaluó el efecto del tratamiento de las células receptoras sobre la transmisión viral. Cuando se trató a las células diana TZM.bl y se las co-cultivó con las CD infectadas, se observaron reducciones de la transmisión del 50% (para las CD infectadas con X4 y R5, respectivamente) en el caso del tratamiento con el G3-S16, mientras que en el tratamiento con G2-NF16 se encontraron descensos del 92% y 73% (Fig. 51B).

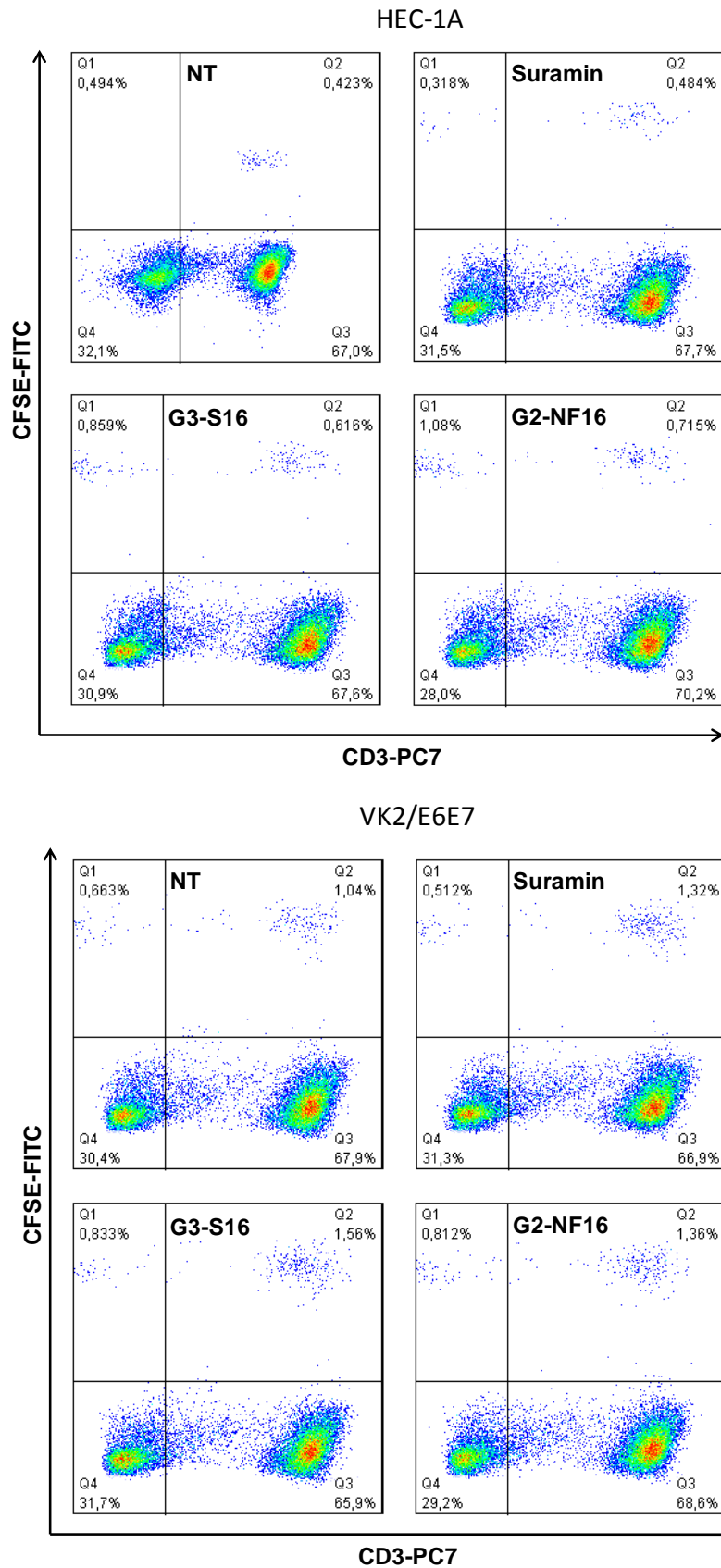


Figura 50. Efecto de los dendrímeros sobre la trans migración celular a través de una monocapa de células epiteliales. **(A)** Actividad de los dendrímeros sobre la trans migración de CMSP marcadas con CFSE a través de una monocapa de HEC-1A. Se realizó un marcaje del marcador de superficie CD3, específico de linfocitos, para estudiar la trans migración de este tipo celular. Se seleccionó la población CFSE+CD3+, dentro de la población total CD3+ de la cámara basal de sistema de transwell, como la población de células migradoras. **(B)** Efecto de G3-S16 y G2-NFG16 sobre la trans migración celular a través de una monocapa de células VK2/E6E7. Se usó suramin como control. Los dot-plots mostrados pertenecen a un experimento representativo.

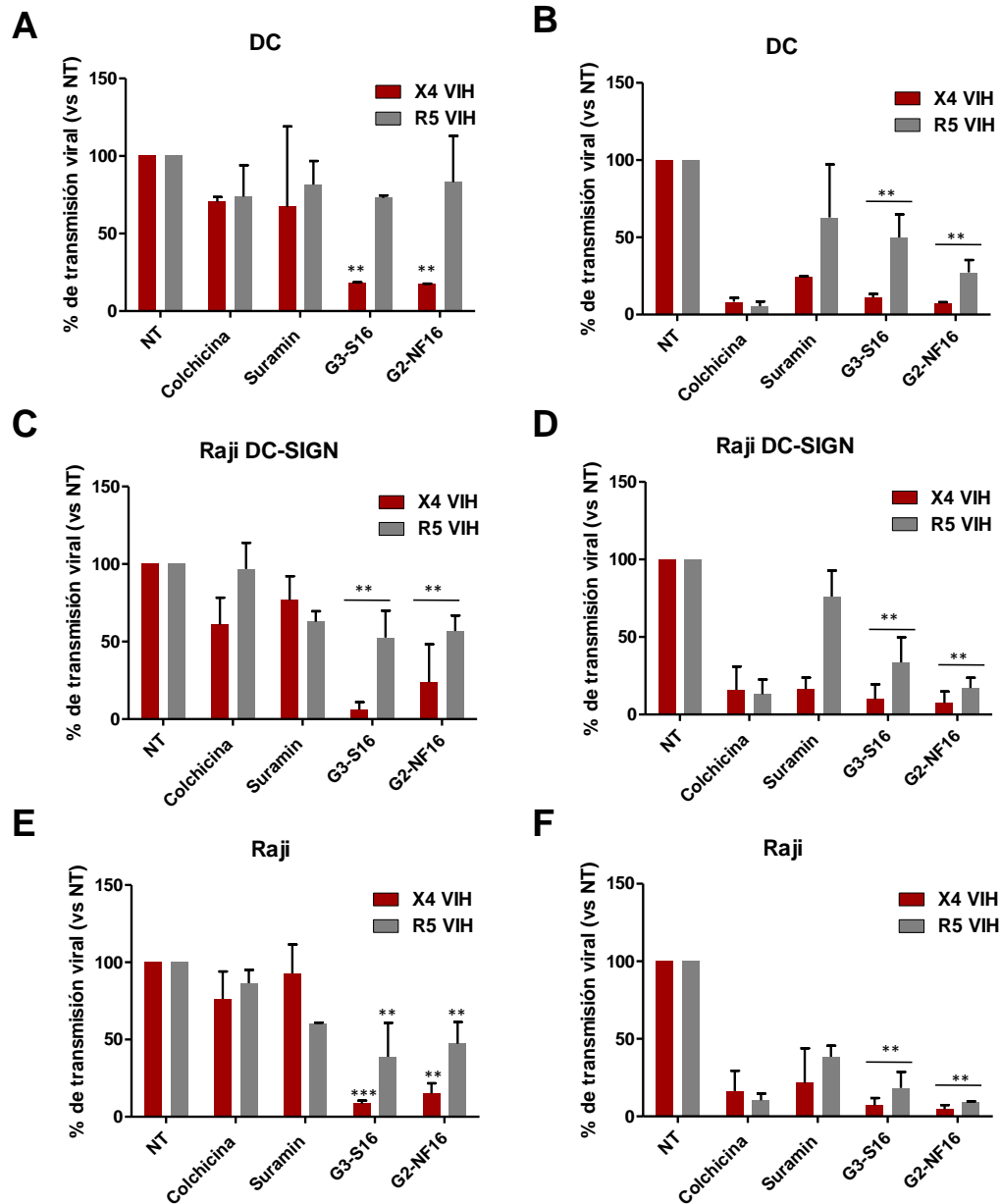


Figura 51. Actividad de los dendrímeros sobre la transmisión célula-célula del VIH. Efecto del pretratamiento de células donadoras dendríticas (CD) primarias humanas (A), Raji-DC-SIGN (C) o Raji (E) infectadas con X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} sobre la transmisión viral después de su co-cultivo con células diana TZM.bl. La transferencia viral se determinó mediante la medida de la actividad luciferasa en las células receptoras TZM.bl. El efecto de G3-S16 y G2-NF16 sobre la transmisión viral después del pretratamiento de las células receptoras también fue evaluado (B,D,F). Se usó colchicina y suramin como controles de inhibición de la transferencia viral. Los datos se representan como la media \pm SD de dos experimentos independientes. Cada experimento se realizó por triplicado. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs control).

DC-SIGN es una de las moléculas descritas en CD capaces de unirse al virus y permitir su internalización celular. Para estudiar el papel de esta molécula en los procesos de transmisión viral célula-célula y la posible acción de los dendrímeros sobre ella, este ensayo se realizó también usando células Raji y Raji-DC-SIGN como células donadoras. Cuando las células Raji-DC-SIGN infectadas con el X4 VIH-1_{NL4.3} se trataron con G3-S16 o G2-NF16, y se co-cultivaron con células TZM.bl, se

obtuvieron reducciones de la transmisión viral del 94% y 76%, respectivamente (Fig. 51C). En el caso de las células Raji-DC-SIGN infectadas con R5 VIH-1_{NL(AD8)}, los tratamientos con los dendrímeros produjeron una reducción de la transmisión del virus de un 47% y 43% (para el G3-S16 y G2-NF16, respectivamente). Cuando las células T2M.b1 receptoras se pretrataron 1h con los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 y luego se co-cultivaron con células Raji-DC-SIGN infectadas por el X4 VIH-1_{NL4.3} se observó un 91% y 92% de inhibición de la transmisión viral (Fig. 51D). En cuanto a la infección por el R5 VIH-1_{NL(AD8)}, cuando se pretrató a las células diana con los compuestos, se obtuvieron inhibiciones del 66% y 83% (para G3-S16 y G2-NF16, respectivamente) en la transmisión viral célula-célula. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron como células donadoras células Raji, que no expresan el marcador de superficie DC-SIGN, infectadas por el X4 VIH-1_{NL4.3} o R5 VIH-1_{NL(AD8)} (Fig. 51E-F).

Por tanto, ambos dendrímeros fueron capaces de impedir la transmisión célula-célula del VIH cuando se usaron células Raji o Raji-DC-SIGN como células donadoras del virus, sugiriendo que el mecanismo de inhibición del paso viral célula-célula es DC-SIGN independiente. Además, esto ocurre tanto si el pretratamiento se realiza en las células donadoras o sobre las células receptoras. Los mismos resultados también se obtuvieron en CD, a excepción de cuando estaban infectadas por el R5 VIH-1_{NL(AD8)}, en cuyo caso no se observaron reducciones significativas de la transmisión viral tras el tratamiento de las células donadoras con los dendrímeros.

Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 dificultan la formación de las sinapsis infecciosas

La transmisión viral célula-célula es más eficiente en la propagación del VIH que la infección causada por partículas virales libres. Esto se debe a la formación de sinapsis virológicas entre las células infectadas y no infectadas a través de las cuales se produce el paso del virus de una célula a otra.

Para determinar el papel de los dendrímeros en la inhibición de la transmisión viral célula-célula, se realizó un ensayo de microscopia confocal en el que se analizó el proceso de trans-infección desde CD donadoras infectadas por el X4 VIH-1_{NL4.3} a células Jurkat, que en este caso se utilizaron como células diana (Fig. 52).

Cuando no se trataron las células, el virus se encontró claramente polarizado hacia las sinapsis de las zonas de contacto de los conjugados celulares CD/Jurkat (Fig. 52A-F). Además, este virus co-localiza con el marcador CD81, como está descrito²²⁹. Sin embargo, se encontró que un tratamiento con los dendrímeros impedía parcialmente la formación de las sinapsis infecciosas, así como la co-localización con el marcador CD81, sugiriendo una distinta localización de los virus en los compartimentos sub-celulares cuando las células están o no tratadas con los dendrímeros (Fig. 52B-C). De este modo, se observó una disminución de alrededor de un 50% en el número de sinapsis infecciosas cuando las células donadoras y receptoras se trataron con los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 o con el control colchicina en relación con las células no tratadas (Fig. 52E).

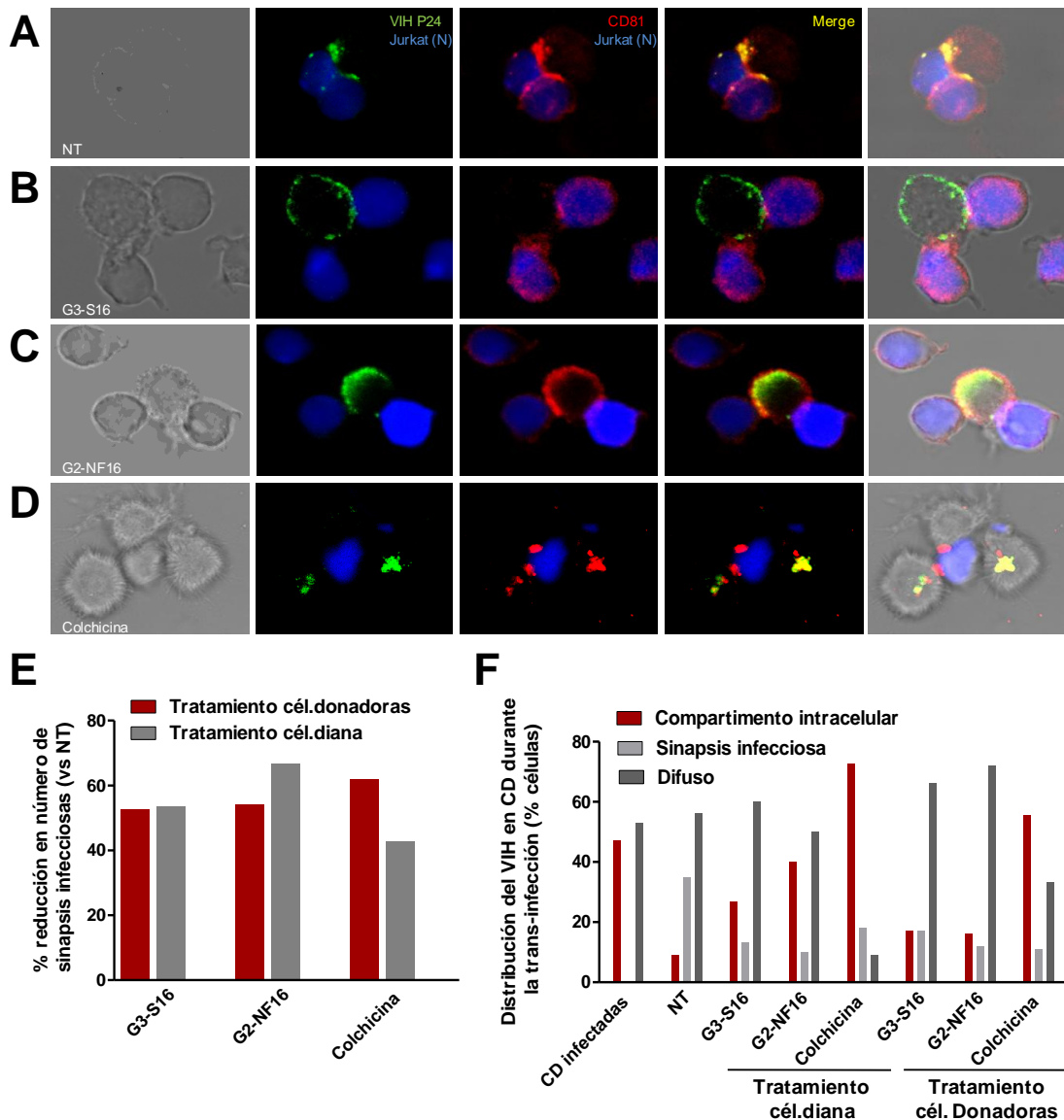


Figura 52. Efecto de los dendrímeros carboxilano sobre las sinapsis infecciosas. Imágenes de microscopía confocal de los contactos entre CD-Jurkat en ausencia (**A**) o presencia de G3-S16 (**B**), G2-NF16 (**C**) o colchicina (**D**). Las células Jurkat fueron teñidas en azul (CFSE-violet), el antígeno P24^{gag} del VIH fue marcado en verde y el marcador CD81 se tiñó en rojo. El número total de contactos entre CD y las células receptoras Jurkat fue contado y se cuantificó el % de sinapsis infecciosas. Se definió una sinapsis infecciosa como un conjugado CD-Jurkat donde la mayoría de las partículas de VIH se encuentran localizadas en la zona de contacto entre ambas células (**A**). El % de reducción en el número de sinapsis infecciosas en relación a las células no tratadas (NT) se muestra en el apartado **E**. Se contaron las sinapsis infecciosas tanto cuando las células donadoras como las células receptoras fueron tratadas con dendrímero. Además, se analizó y cuantificó la distribución de las partículas virales en el interior de las CD durante el proceso de trans-infección (**F**). Las imágenes de fluorescencia muestran un diferente patrón de distribución del VIH en los conjugados CD-Jurkat: sinapsis infecciosa, compartimento intracelular o distribución difusa en el citoplasma o en la membrana. Se cuantificó el número de eventos total a partir de dos experimentos independientes. La condición *CD infectadas* son células sin contactos con Jurkat y la condición *NT* son CD en contacto con Jurkat pero sin tratamiento.

Se estudió también la distribución de las partículas de VIH en el interior de las CD durante el proceso de trans-infección cuando éstas o las células diana se trataron con los diferentes compuestos. De este modo, cuando las células donadoras o receptoras se trataron y posteriormente se co-cultivaron, se detectaron diferencias en la distribución del VIH, así como en la co-localización entre las partículas virales y el marcador CD81 (Fig. 52F). En los controles de CD cargadas con el VIH, mayoritariamente el virus se encuentra ubicado en un compartimento intracelular tipo saco, en el que éste co-localiza con el marcador CD81^{229,230}. Cuando las células son tratadas con colchicina, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos que frena el tráfico vesicular, y co-cultivadas con Jurkat, la mayoría de las CD contienen el virus en este compartimento intracelular (73% y 56% cuando se trata a las células diana y donadoras, respectivamente). Sin embargo, en el caso del tratamiento de las CD donadoras, en la mayoría de las CD el virus aparece distribuido de una forma difusa en el citoplasma o debajo de la membrana en lugar de en este compartimento celular (66% y 72% del total de CD para los tratamientos con G3-S16 y G2-NF16). Además parece existir un desacoplamiento en la co-localización del VIH y del CD81. En el caso de un tratamiento de las células Jurkat, se observó un incremento de CD conteniendo el VIH en el compartimento celular en comparación con lo que se observaba en caso de tratamiento de las células donadoras (26% y 40% para G3-S16 y G2-NF16 cuando se trataron las Jurkat vs. 16% para ambos dendrímeros cuando se trataron las CD portadoras del VIH).

Resumiendo, el tratamiento con los dendrímeros impide la transmisión viral célula-célula al limitar la formación de la sinapsis virológica. Además la pérdida de la co-localización entre el VIH y el CD81 sugiere una redistribución del VIH fuera del compartimento intracelular tipo saco en CD.

C. Estudio de la eficacia antiviral de la combinación de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 entre sí y con compuestos antirretrovirales.

Se sabe que la combinación de al menos dos familias de antirretrovirales es más efectiva que la monoterapia en el tratamiento del VIH. Por tanto, la combinación de distintos compuestos es una estrategia a tener en cuenta en el diseño de nuevos microbicidas. En relación con esto, se realizaron combinaciones entre los distintos dendrímeros carbosilanos, así como entre éstos y diferentes grupos de compuestos antirretrovirales para determinar si existía una mejora en la capacidad antiviral de las mezclas en comparación con la acción anti-VIH de cada uno de los compuestos por separado. Los dendrímeros se combinaron con antirretrovirales del grupo de los inhibidores de la entrada, como el MVC, y con agentes de la familia de los inhibidores de la transcriptasa inversa, tales como el AZT, el EFV o el TFX.

Combinaciones entre G3-S16 y G2-NF16

Se evaluó el efecto de la combinación entre sí de los dendrímeros polianiónicos de tipo carbosilano G3-S16 y G2-NF16 sobre la inhibición de la infección por aislados X4 y R5 del VIH en la línea celular TZM.bl. Para ello se combinaron concentraciones equimolares de ambos dendrímeros en un rango que osciló entre 0,01 y 1 µM. Se encontró una inhibición prácticamente total de la infección

por el X4 VIH-1_{NL4.3} en la combinación de concentraciones 0,1 μ M de cada uno de los dendrímeros (Fig. 53A). En el caso del R5 VIH-1_{NL(AD8)} se consiguió una inhibición cercana al 90% con la mezcla de mayor concentración (1 μ M de G3-S16+1 μ M de G2-NF16) (Fig. 53B).

Para determinar el tipo de interacción entre ambos compuestos se llevó a cabo un análisis de los datos obtenidos mediante el uso del software CalcuSyn. Este método, basado en el teorema del Índice de Combinación (CI)-Isoblograma de Chou y Talalay²²⁰ permite determinaciones cuantitativas de las interacciones químicas donde los CI <1, =1 y >1 indican sinergia, efecto aditivo y antagonismo, respectivamente. En el caso del X4 VIH-1_{NL4.3}, se observó que las combinaciones de G3-S16 y G2-NF16 tenían un efecto sinérgico, o al menos aditivo, sobre la inhibición de la infección viral. Se obtuvieron valores de CI sinérgicos a nivel de la combinación de ambos compuestos a sus EC₅₀ y EC₇₅ (CI=0,48 y 0,70, respectivamente), mientras que a nivel de la EC₉₀ se determinó una interacción de tipo aditivo entre ambos (CI=1,02). Sin embargo, no se encontraron interacciones positivas de los dendrímeros en su actividad inhibitoria frente al R5 VIH-1_{NL(AD8)}.

Combinaciones entre dendrímeros y el inhibidor de la fusión Maraviroc

Se estudió también la interacción entre los dendrímeros carbosilanos G3-S26 y G2-NF16 y el MVC, un antagonista del correceptor CCR5 comprendido en el grupo de los inhibidores de la entrada y la fusión.

Primeramente, para conocer la eficiencia de este compuesto frente a la infección por el VIH-1 en el modelo *in vitro*, y poder así compararlo con los dendrímeros en estudio, se determinó la EC₅₀ de los distintos agentes antivirales. Se analizó la actividad antiviral de un rango de concentraciones de G3-S16, G2-NF16 o MVC frente al R5 VIH-1_{NL(AD8)} y el aislado viral dual trópico X4/R5 VIH-1_{89.6} (Fig. 54). Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 inhibieron el R5 VIH-1_{NL(AD8)} con una EC₅₀ media de 27,33nM y 28,78nM, respectivamente. La EC₅₀ para el MVC frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} fue de 0,13nM (Fig. 54A). Sin embargo, y como era esperable debido a su papel inhibidor específico sobre el correceptor CCR5, el MVC fue menos activo frente al aislado con tropismo dual X4/R5 VIH-1_{89.6}, con una EC₅₀ media de 3,10 μ M (Fig. 54B). Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 inhibieron al X4/R5 VIH-1_{89.6} con una EC₅₀ de 525,23nM y 205,5nM, respectivamente. Mientras que la eficiencia de inhibición del MVC fue 23.800 veces menor frente al virus dual X4/R5 VIH-1_{89.6} en comparación con el aislado R5 VIH-1_{NL(AD8)}, en el caso de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 estos valores fueron únicamente de 19 y 7 veces menores, lo que muestra el alto potencial antiviral de estos compuestos frente a distintos tipos y cepas del VIH-1.

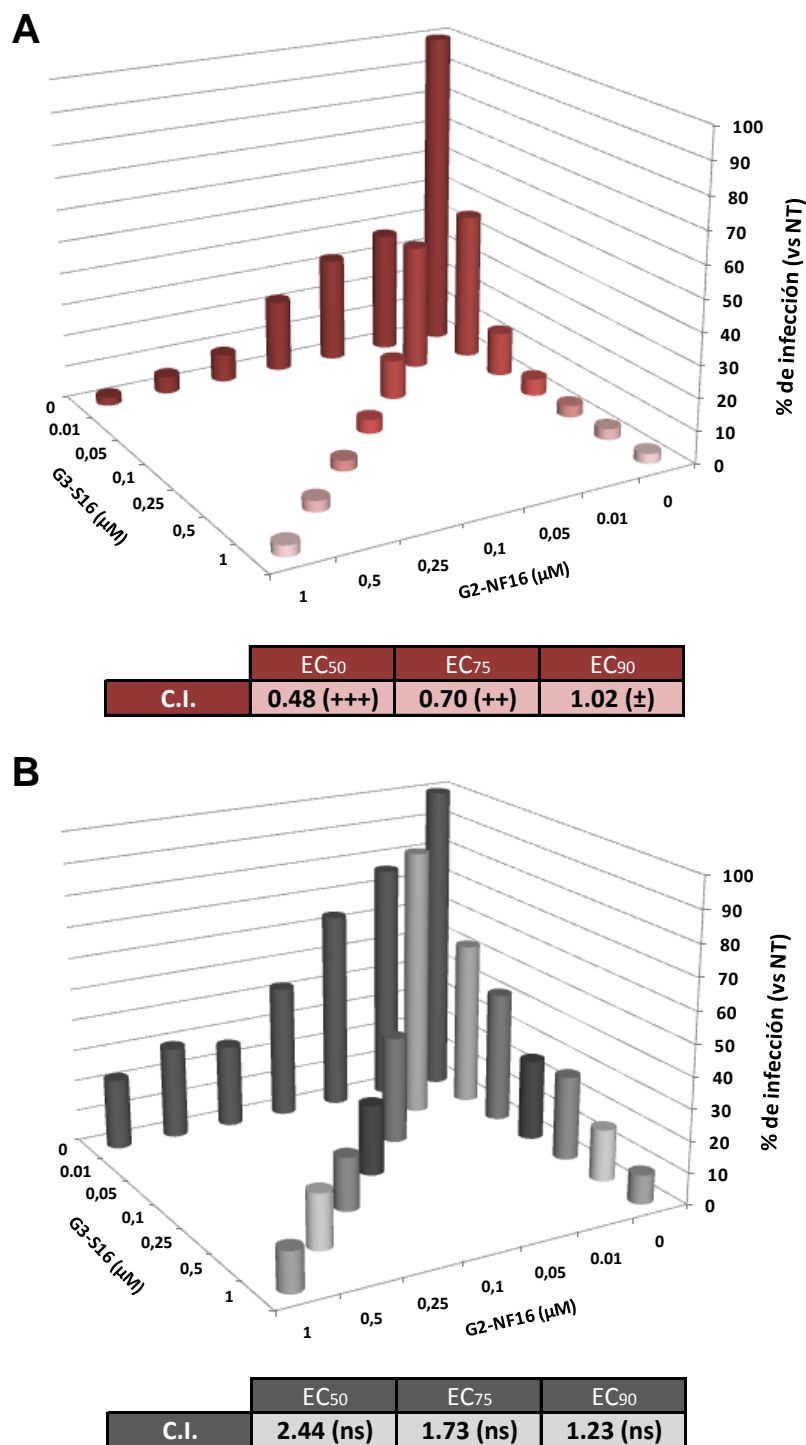


Figura 53. Actividad antiviral de la combinación de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 frente al X4 VIH-1_{NL4.3} (A) y R5 VIH-1_{NL(AD8)} (B) e índices de combinación (CI) de las mezclas a la EC₅₀, EC₇₅ y EC₉₀. Células TZM.bl fueron tratadas con combinaciones equimolares de G3-S16 y G2-NF16 durante 1h antes de su infección. A los tres días post-infección se cuantificó la infección viral mediante la medida de los niveles de actividad luciferasa. El porcentaje de infección se calculó como % de actividad luciferasa en cada condición vs actividad luciferasa en células no tratadas. Los datos representan la media de tres experimentos. Los CI se calcularon a partir de los valores de inhibición medios de los tres experimentos. CI<0,9 indica sinergia; 0,9<CI<1,1 indica efecto aditivo y CI>1,1 indica ausencia de efecto positivo. Niveles de sinergia: 0,85<CI<0,9: sinergia débil; 0,7<CI<0,85: sinergia moderada; 0,3<CI<0,7: sinergia; 0,1<CI<0,3: sinergia fuerte; 0,1>CI: sinergia muy fuerte. (ns: no sinergia).

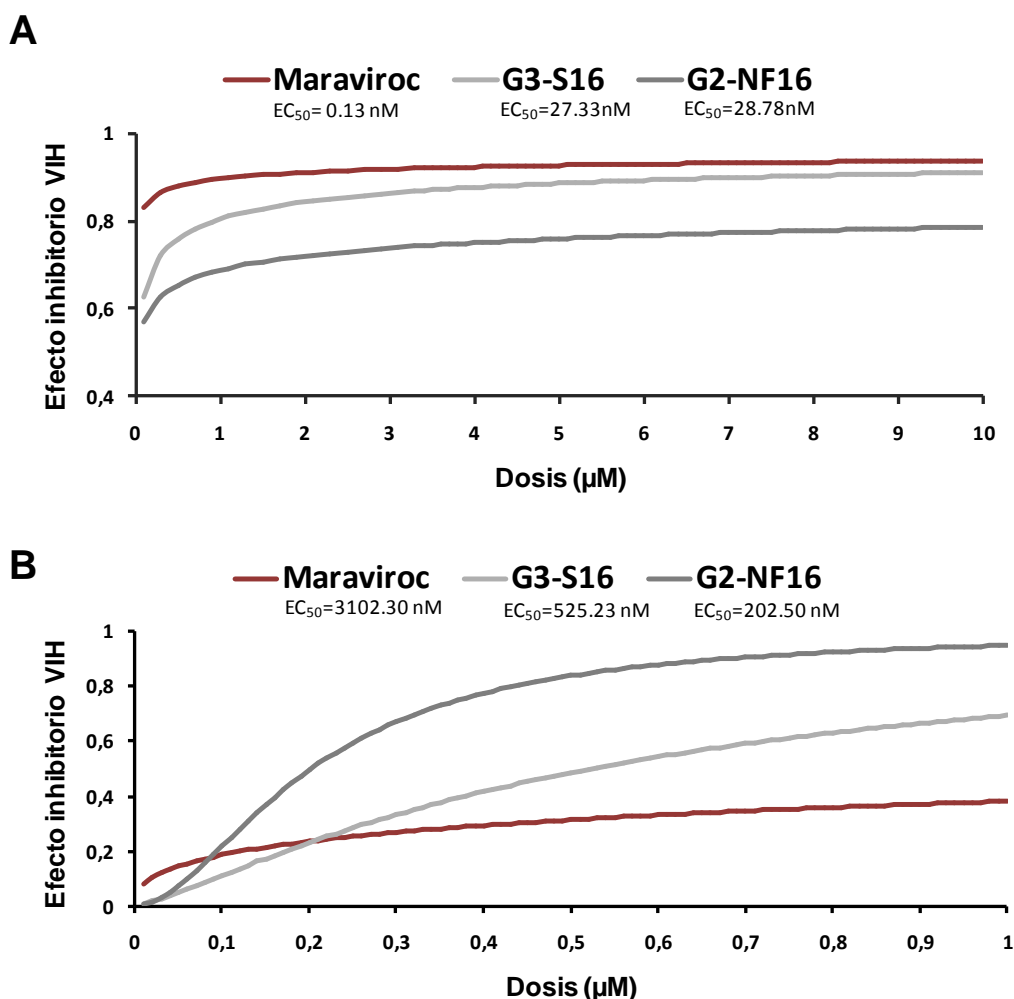


Figura 54. Curva dosis/efecto representando la inhibición de R5 VIH-1_{NL(AD8)} (A) y dual X4/R5 VIH-1_{89.6} (B) por G3-S16, G2-NF16 o maraviroc (MVC) en la línea celular TZM.bl. Las células se trataron con concentraciones crecientes de G3-S16, G2-NF16 o MVC durante 1h antes de su infección con el VIH-1. A los 3 días, se cuantificó la infección viral mediante la medida de los niveles de actividad luciferasa. Los valores de EC₅₀ (nm) se calcularon por regresión lineal mediante el uso del software CalcuSyn. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Durante el proceso de infección por el VIH-1 se ha demostrado una predominancia de los virus de tropismo R5. Los tres compuestos estudiados mostraron una alta eficiencia en la inhibición de este tipo viral; sin embargo, cabe la duda de preguntarse por la actividad y eficiencia de estos compuestos por separado en el caso de una infección mixta X4/R5 o por virus de tropismo dual. Un microbicida debe ser efectivo frente a un amplio espectro de aislados virales. Por ello, se investigó la potencial actividad antiviral de combinaciones de MVC con los dendrímeros G3-S16 ó G2-NF16 frente a los virus R5 VIH-1_{NL(AD8)} y X4/R5 VIH-1_{89.6} en un modelo *in vitro* basado en las células reporteras TZM.bl. Distintas concentraciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 se mezclaron con concentraciones fijas de MVC (250nM ó 500nM) (Fig. 55). Previamente, se comprobó la toxicidad de estas combinaciones mediante MTS, no encontrándose una mayor toxicidad celular asociada a las mismas. Las combinaciones resultaron en perfil inhibitorio más eficiente contra ambos virus, y se alcanzó una completa inhibición del R5 VIH-1_{NL(AD8)} cuando se mezclaron 500nM/500nM de MVC/G3-S16 ó 500nM/1000nM de MVC/G2-NF16 (Fig. 55A-B). En el caso del X4/R5 VIH-1_{89.6} también se

consiguió una inhibición total de la infección cuando se combinaron MVC/G2-NF16 (250nM/1000nM) (Fig. 55D). A las concentraciones ensayadas, G3-S16 en combinación con MVC no inhibió en su totalidad la infección por el X4/R5 VIH-1_{89.6} en TZM.bl, aunque sí que se observó un efecto inhibitorio adicional medio del 66% para la mezcla MVC/G3-S16 en comparación con la actividad de los compuestos solos (en referencia a MVC (500nM) y G3-S16 (500nM)) (Fig. 55C). En resumen, la combinación del inhibidor de CCR5 MVC con los dendrímeros aniónicos de tipo carboxilano permite una completa, o casi completa, inhibición de la infección por el VIH-1 en virus R5 o con tropismo dual.

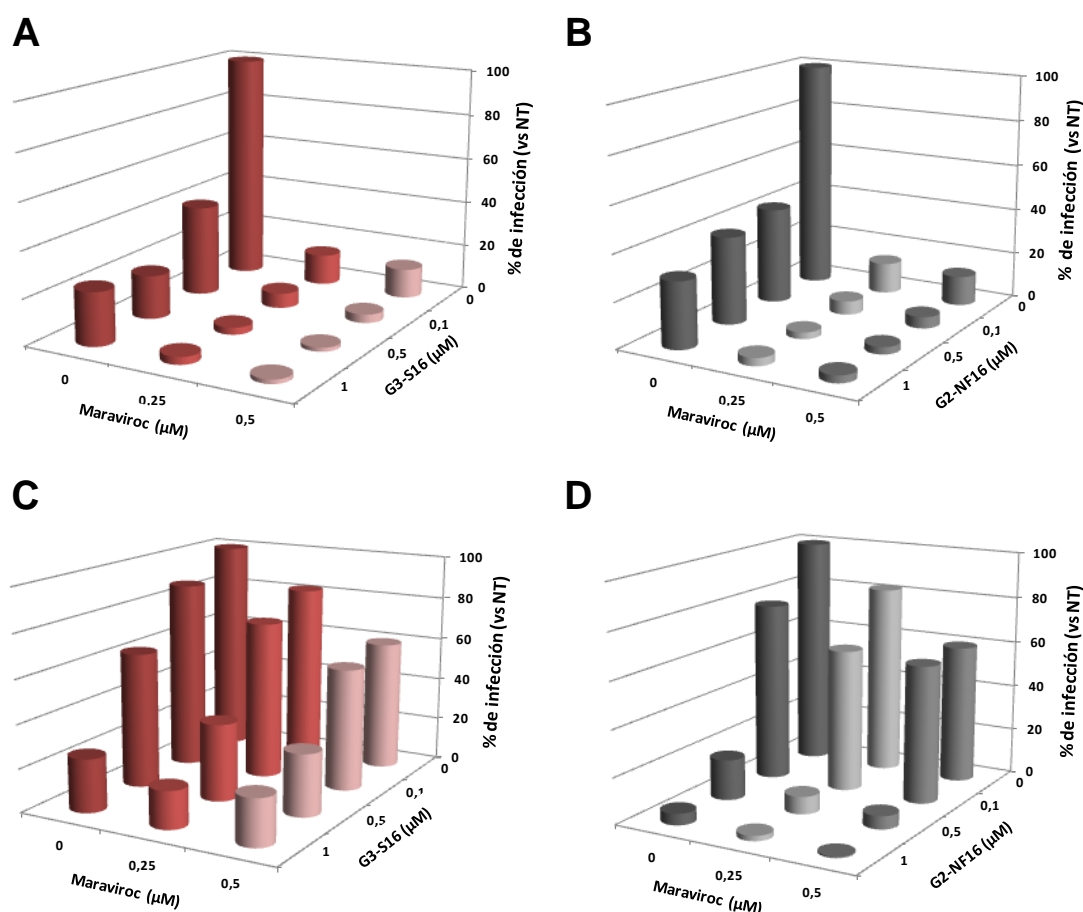


Figura 55. Perfil antiviral del dendrímero G3-S16 solo o en combinación con MVC frente a la infección por R5 VIH-1_{NL(AD8)} (A) o dual X4/R5 VIH-1_{89.6} (C) (% de actividad luciferasa vs células no tratadas) en TZM.bl. Actividad antiviral del G2-NF16 en combinación con MVC frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} (B) o el virus de tropismo dual VIH-1_{89.6} (D). Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Debido al incremento en el efecto inhibitorio detectado tras la mezcla de los compuestos, se determinaron los índices de combinación (CI) de las mismas con el fin de analizar el tipo de interacciones entre los diferentes agentes. Los valores de CI obtenidos frente al R5 VIH-1_{NL(AD8)} variaron entre 0,005 y 0,033, resultando en un efecto sinérgico muy fuerte para cada combinación (MVC/G3-S16 o MVC/G2-NF16)(Fig. 56A). En el caso del X4/R5 VIH-1_{89.6} solamente se detectó sinergismo moderado (CI<0,85) cuando ambas concentraciones de MVC se combinaron con los

dendrimeros a concentraciones $>500\text{nM}$ (Fig. 56B). Sin embargo, sí que se encontró un efecto sinérgico ($CI < 0,4$) para la combinación de MVC/G2-NF16 ($500\text{nM}/1000\text{nM}$) en este modelo experimental.

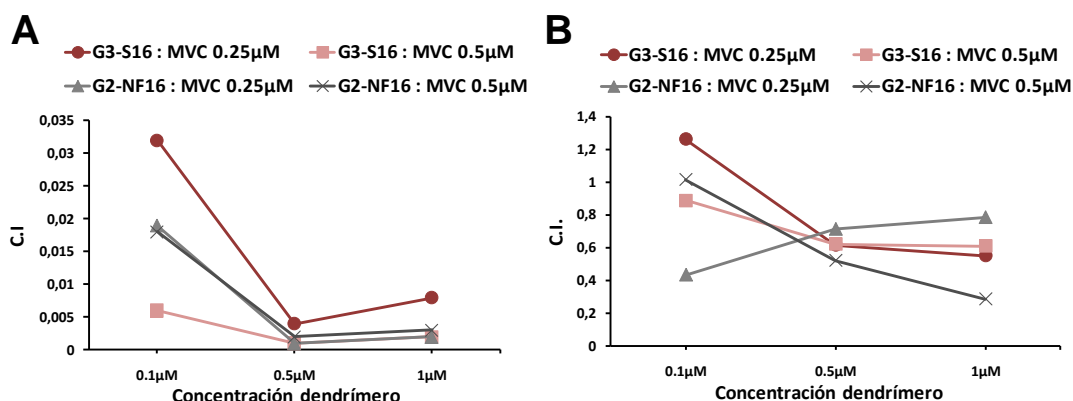


Figura 56. Índices de combinación (CI) de las mezclas de distintas concentraciones de G3-S16 y G2-NF16 con concentraciones fijas de MVC frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} (A) y dual X4/R5 VIH-1_{89,6} (B) en células TZM.bl. Los CI calculados se obtuvieron a partir de la media de tres experimentos independientes. $CI < 0,9$ indica sinergismo; $0,9 < CI < 1,1$ indica un efecto aditivo y $CI > 1,1$ indica ausencia de interacción positiva. Nivel de sinergia: $0,85 < CI < 0,9$: sinergia leve; $0,7 < CI < 0,85$: sinergia moderada; $0,3 < CI < 0,7$: sinergia; $0,1 < CI < 0,3$: sinergia fuerte; $0,1 > CI$: sinergia muy fuerte.

El mismo tipo de experimento se realizó con X4 VIH-1_{NL4-3} *in vitro* para demostrar que las combinaciones de MVC con G3-S16 y G2-NF16 no afectaban a la acción de los dendrimeros sobre virus X4 trópicos (Fig. 57). Como se preveía, el MVC solo no bloqueó la infección por el X4 VIH-1_{NL4-3} en células TZM.bl. Sin embargo, los dendrimeros continuaron siendo muy activos frente a este tipo viral. Por tanto, la actividad inhibitoria de los dendrimeros sobre el X4 VIH-1_{NL4-3} no se ve afectada por el MVC, no presentándose ningún tipo de interacciones, positivas o negativas, entre ellos.

Finalmente, y para confirmar los datos obtenidos en TZM.bl, combinaciones equimolares entre MVC y ambos dendrimeros carbosilanos se probaron en CMSP frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} y X4/R5 VIH-1_{89,6}. Se encontró también un fuerte efecto sinérgico frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} y un moderado efecto sinérgico frente al aislado de tropismo dual a los valores calculados de EC_{50} (Tabla 6). Las combinaciones de G3-S16 y G2-NF16 con MVC fueron sinérgicas a nivel de las EC_{70} y EC_{90} frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Además, se encontró actividad sinérgica cuando G2-NF16 se combinó con MVC frente a X4/R5 VIH-1_{89,6} a los niveles de EC_{70} y EC_{90} .

En resumen, se puede concluir que la combinación del antirretroviral MVC con los dendrimeros es más efectiva frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} y R5/X4 VIH-1_{89,6} que cada uno de estos compuestos por separado. Estas combinaciones no permiten una inhibición total del VIH-1 en el modelo *in vitro* descrito en esta Memoria; sin embargo, sí que muestran una actividad sinérgica, incrementando el potencial antiviral de cada uno de los compuestos.

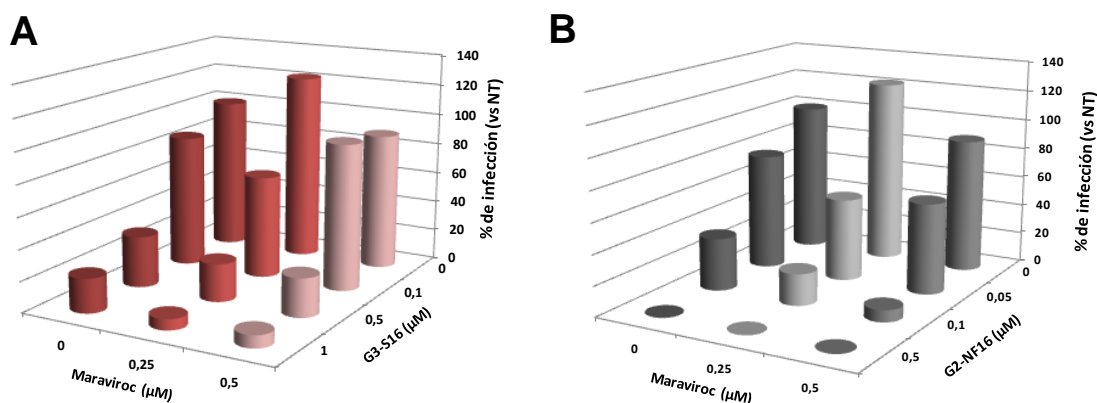


Figura 57. Actividad antiviral del G3-S16 (A) y del G2-NF16 (B) solos o en combinación con MVC frente a la infección por X4 VIH-1_{NL4.3} (% de actividad luciferasa vs células no tratadas) en TZM.bl. Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

Combinación	Virus	CI ^{a,b}		
		EC ₅₀	EC ₇₅	EC ₉₀
G3-S16/maraviroc	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.014 (+++++)	0.033 (+++++)	0.079 (+++++)
G2-NF16/maraviroc	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.001 (+++++)	0.001 (+++++)	0.180 (++++)
G3-S16/maraviroc	X4/R5 VIH-1 _{89.6}	0.704 (++)	ns	ns
G2-NF16/maraviroc	X4/R5 VIH-1 _{89.6}	0.775 (++)	0.835 (++)	0.897 (+)

Tabla 6. Índices de combinación (CI) obtenidos a partir de diferentes combinaciones equimolares (1:1) entre G3-S16 y G2-NF16 con MVC frente a la infección por R5 VIH-1_{NL(AD8)} y X4/R5 VIH-1_{89.6} en CMSP. Los CI calculados se obtuvieron a partir de la media de tres experimentos independientes.

^a Índice de combinación (CI) calculado a nivel de la EC₅₀, EC₇₅ y EC₉₀. CI<0,9 indica sinergismo; 0,9<CI<1,1 indica un efecto aditivo y CI>1,1 indica ausencia de interacción positiva. ns = "no sinergia".

^b Nivel de sinergia: 0,85<CI<0,9: sinergia leve; 0,7<CI<0,85: sinergia moderada; 0,3<CI<0,7: sinergia; 0,1<CI<0,3: sinergia fuerte; 0,1>CI: sinergia muy fuerte.

Cada experimento se realizó por duplicado. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

Combinaciones entre dendrímeros carboxilanos e inhibidores de la transcriptasa reversa: ATZ, EFV y TFV

Una vez demostrada que la combinación del MVC con los dendrímeros polianiónicos de tipo carboxilano G3-S16 y G2-NF16 incrementa la actividad anti-VIH de los compuestos, no sólo de forma aditiva, sino también sinérgica, se evaluó el tipo de interacciones de estas nanopartículas con otras familias de antirretrovirales como los inhibidores de la retrotranscriptasa. Se analizó el potencial inhibidor de combinaciones de estos dendrímeros con algunos miembros de este grupo como el AZT, el EFV o el TFV.

Al igual que en el caso anterior de combinación con el MVC, se analizó inicialmente la eficacia antiviral de cada uno de los compuestos frente a virus X4 y R5 mediante la determinación de su EC_{50} en el modelo *in vitro* empleado de células TZM.bl. G3-S16 y G2-NF16 mostraron una actividad inhibitoria del X4 VIH-1_{NL4.3} con una EC_{50} media de 96nM y 33nM, respectivamente (Fig. 58A). Por su parte, la EC_{50} del AZT, EFV y TFV frente al X4 VIH-1_{NL4.3} fue de 5nM, 35nM y 12nM. Aunque G3-S16 presentó el mayor valor de EC_{50} , y por tanto es el compuesto menos efectivo en estos ensayos, consiguió, a la concentración de 0,5 μ M una inhibición de la infección para el X4 VIH-1_{NL4.3} cercana al 90 % en TZM.bl. En cuanto al virus R5 VIH-1_{NL(AD8)}, G3-S16 y G2-NF16 presentaron una EC_{50} media de 67,5nM y 15nM, respectivamente, mientras que para AZT, EFV y TFV la EC_{50} fue de 53nM, 59nM y 10nM (Fig. 58B). Por tanto, la EC_{50} de ambos dendrímeros se encuentra en el mismo rango que la de los ARV estudiados.

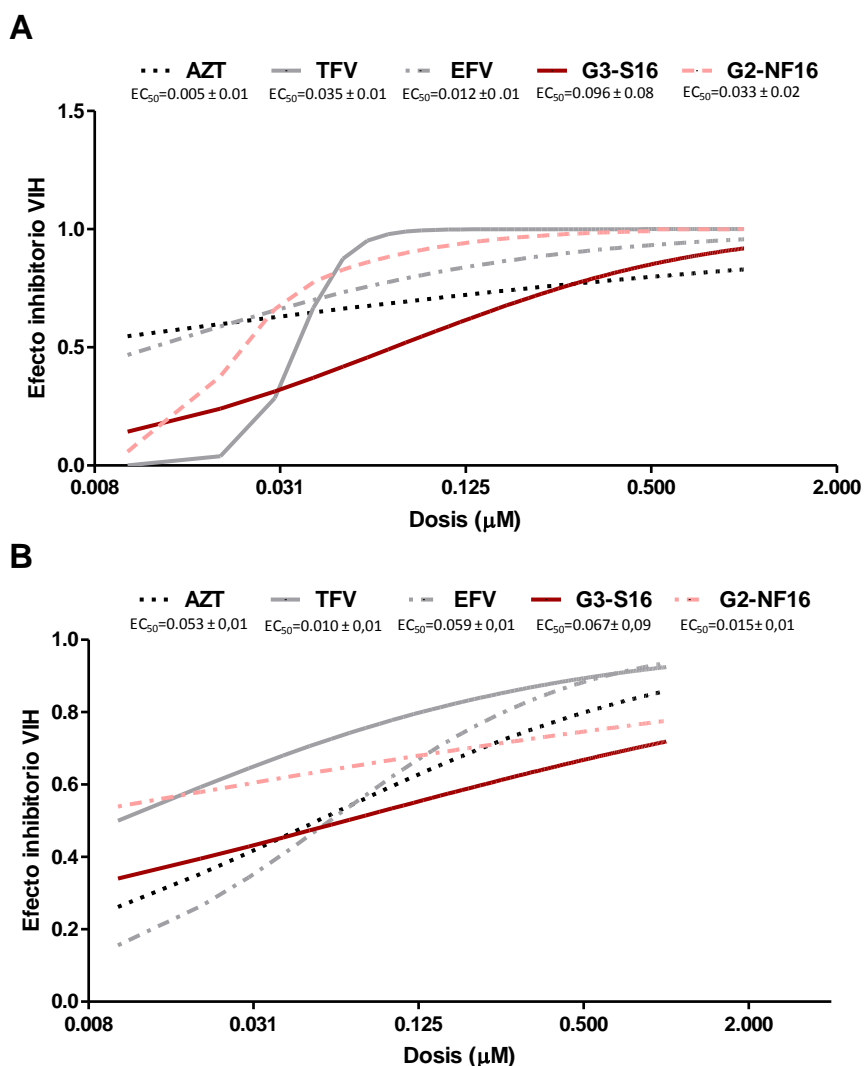


Figura 58. Curva dosis/efecto representando la inhibición de la infección por X4 VIH-1_{NL(4.3)} (A) y R5 VIH-1_{NL(AD8)} (B) por AZT, TFV, EFV, G3-S16 o G2-NF16 en la línea celular TZM.bl. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de los dendrímeros o los ARV durante 1h antes de su infección con el VIH-1. A los 3 días, se cuantificó la infección viral mediante la medida de los niveles de actividad luciferasa. Los valores de EC_{50} (μ m) se calcularon por regresión lineal mediante el uso del software CalcuSyn y se representan como media \pm SD. Las curvas representan el log2 de la concentración de cada compuesto vs inhibición del VIH. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Aunque en estos ensayos los valores de EC_{50} de ambos dendrímeros fueron mayores para el X4 VIH-1_{NL4.3} que para el R5 VIH-1_{NL(AD8)}, tanto G3-S16 como G2-NF16 fueron más eficaces frente al virus X4 que frente al R5 (inhibiciones del 90% y 100% para X4 VIH-1_{NL4.3} y de alrededor de un 80% para el R5 VIH-1_{NL(AD8)} a la concentración de 1 μ M).

Tras determinar la actividad antiviral de cada uno de los compuestos por separado, se evaluó la potencia anti-VIH de las diferentes concentraciones entre los dendrímeros y los ARV estudiados en células TZM.bl. Se probaron combinaciones de G3-S16 y G2-NF16 con AZT, EFV y TFV frente a X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Todas las combinaciones ensayadas resultaron en un mejor perfil inhibitorio frente a ambos tipos virales respecto al efecto de cada droga de forma individual (Fig. 59). Se obtuvieron unos valores de inhibición del VIH-1 cercanos o del 100% para todas las combinaciones ensayadas, a excepción de la combinación de los dendrímeros con AZT frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Aún así, las eficiencias de estas combinaciones fueron cercanas al 90% de inhibición. Cuando se combinaron 0,5 μ M de G3-S16 con concentraciones de 0,1 μ M de AZT, 0,1 μ M de EFV y 0,05 μ M de TFV se obtuvo una total o casi completa inhibición del X4 VIH-1_{NL4.3} (Fig. 59A-C). En cuanto al R5 VIH-1_{NL(AD8)}, se consiguió una inhibición del 100% del virus cuando se mezclaron concentraciones de 1 μ M del G3-S16 con 0,1 μ M y 0,05 μ M de EFV y TFV, respectivamente (Fig. 59D-F). Además, combinaciones de 0,1 μ M de G2-NF16 con 0,01 μ M de AZT, 0,1 μ M de EFV y 0,05 μ M de TFV fueron capaces de inhibir completamente la infección por X4 VIH-1_{NL4.3} (Fig. 59G-I). Combinaciones de 0,5 μ M de G2-NF16 con 0,1 μ M de EFV y 0,05 μ M de TFV también consiguieron inhibiciones del 100% del R5 VIH-1_{NL(AD8)}, confirmando el potencial de este tipo de estrategias combinatorias (Fig. 59K-L).

Una vez demostrado el incrementado efecto inhibitorio de la mezcla de los dendrímeros carbosilanos con los ARV frente al VIH-1, se determinaron los CI de estas combinaciones para analizar el tipo de interacciones entre los distintos compuestos. Se analizaron los valores de inhibición obtenidos de la mezcla de concentraciones fijas de 0,01 μ M y 0,1 μ M de AZT y EFV, ó 0,01 μ M y 0,05 μ M de TFV, con concentraciones crecientes de G3-S16 ó G2-NF16 (Fig. 60). Los valores de CI obtenidos fueron sinérgicos para todas las combinaciones entre G3-S16+AZT, G3-S16+TFV, G2-NF16+AZT y G2-NF16+TFV frente a X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Todos los valores de CI mostraron un efecto de sinergia fuerte o de sinergia, a excepción de la combinación de 1 μ M G2-NF16+0,01 μ M AZT, donde se obtuvieron valores de sinergia débil (CI=0,808) (Fig. 60B). En el caso de las combinaciones de dendrímero+EFV, se encontró sinergia fuerte o muy fuerte cuando ambos dendrímeros se mezclaron con concentraciones fijas de EFV frente a la infección por el R5 VIH-1_{NL(AD8)} (valores de CI entre 0,310 y 0,018) (Fig. 60C-D). Además, también se observaron interacciones de tipo sinérgico, fuerte o muy fuerte, cuando se combinaron 0,1 μ M, 0,5 μ M ó 1 μ M de G3-S16 ó G2-NF16 con 0,1 μ M de EFV frente a X4 VIH-1_{NL4.3}. No se encontró sinergia cuando se mezcló 0,01 μ M de EFV con concentraciones de 0,5 μ M de G3-S16 o superiores a 0,5 μ M de G2-NF16 (CI>1,1) (Fig.60C-D). Estos resultados indican un perfil sinérgico o aditivo de las combinaciones entre dendrímeros carbosilanos y los inhibidores de la RT frente a los virus R5 y X4 VIH-1 en células TZM.bl, a excepción de unas pocas combinaciones entre dendrímero+EFV frente a X4 VIH-1_{NL4.3}.

Con el fin de confirmar estos resultados, también se estudió el efecto de las combinaciones de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 con los inhibidores de la RT en células primarias como las CMSP, principales dianas del virus. Se realizaron combinaciones a un ratio equimolar (1:1) entre ambos tipos

de compuestos, evaluando su actividad tanto frente a X4 como a R5 VIH-1. Además, previamente, se realizó un análisis de viabilidad con el fin de determinar la toxicidad en CMSP de las distintas combinaciones. No se encontraron efectos tóxicos para ninguna de las mezclas tras 24h de exposición (Tabla 7).

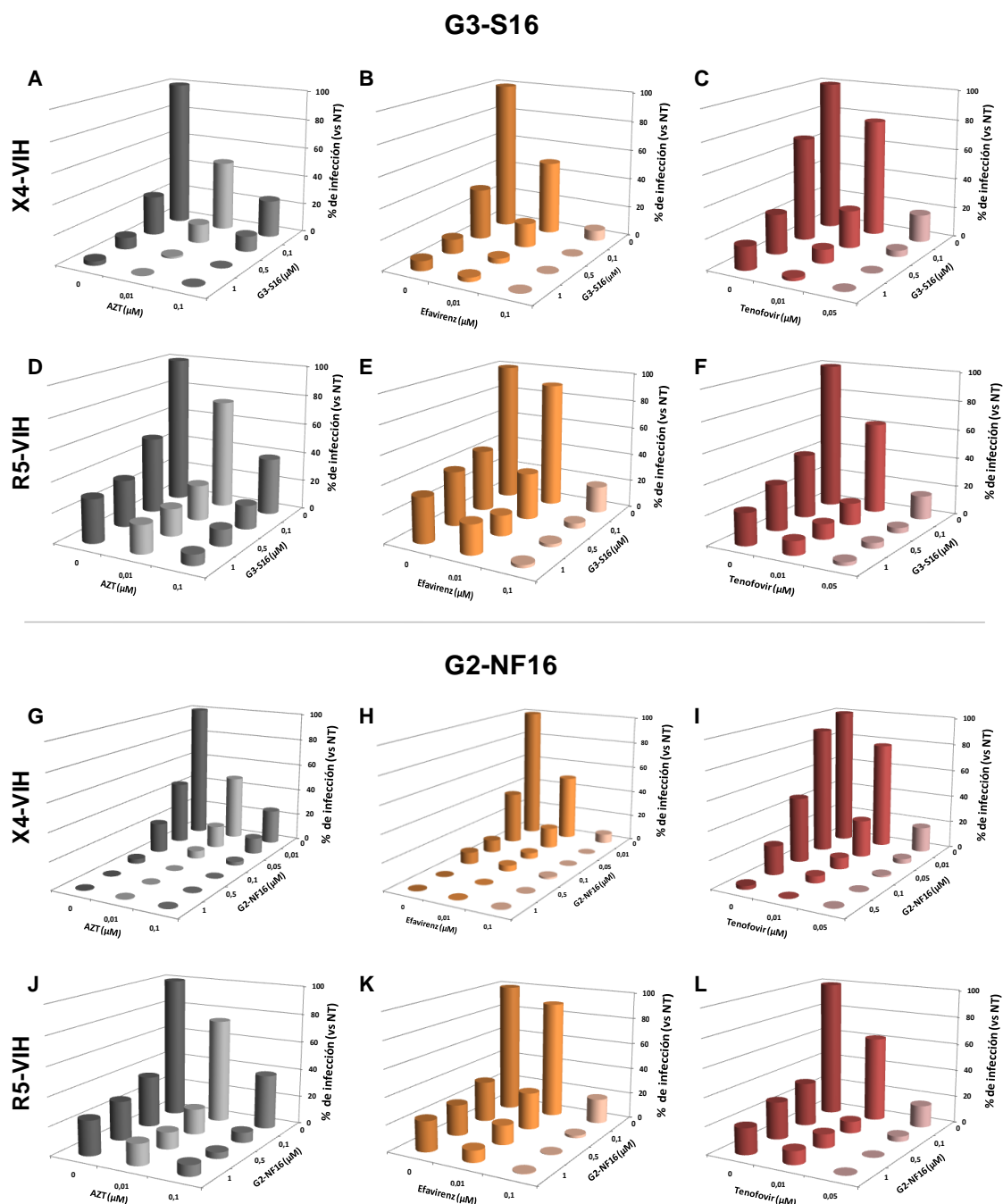


Figura 59. Actividad antiviral de los dendrímeros G3-S16 (A-F) y G2-NF16 (G-L) solos o en combinación con AZT (A,D,G y J), EFV (B, E, H y K) o TFV (C, F, I y L) frente al X4 VIH-1_{NL4.3} (A, B, C, G, H y I) o R5 VIH-1_{NL(AD8)} (D, E, F, J, K y L) (% de infección calculado como % de actividad luciferasa vs células no tratadas) en células TZM.bl. Las células fueron tratadas con las distintas combinaciones de G3-S16 o G2-NF16 y los compuestos ARV durante 1h antes de su infección por el VIH-1. Tras 72h, la infección viral se cuantificó mediante la medida de los niveles de actividad luciferasa. Cada experimento se realizó por triplicado. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

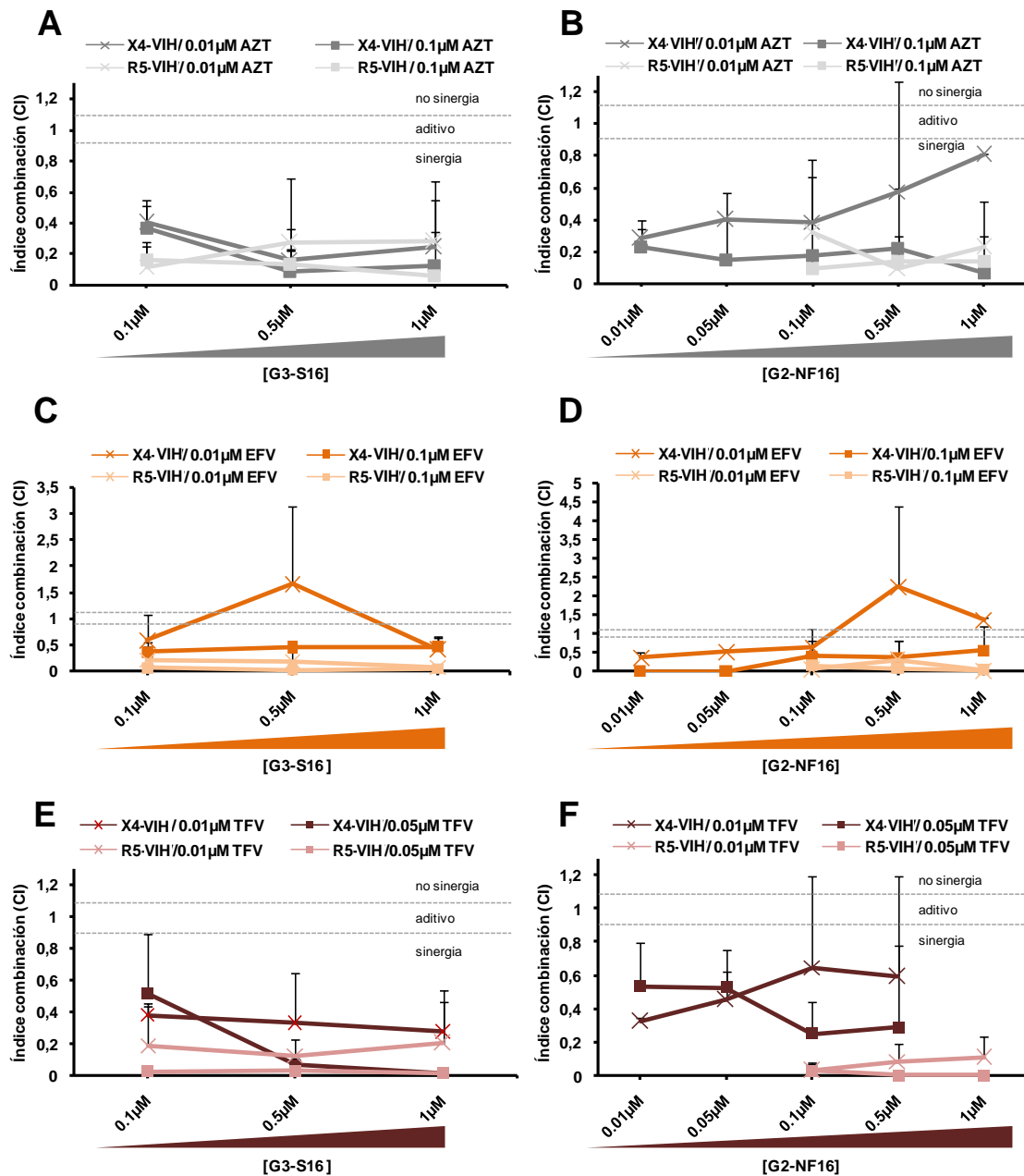


Figura 60. Índice de combinación (CI) para varias combinaciones de G3-S16 y G2-NF16 con concentraciones fijas de AZT, EFV o TFV frente a X4 VIH-1_{NL4.3} (**A, C, F**) y R5 VIH-1_{NL(AD8)} (**B, D, E**) en TZM.bl. CI < 0,9 indica sinergia; 0,9 < CI < 1,1 indica efecto aditivo y CI > 1,1 indica ausencia de sinergia o efecto positivo. Nivel de sinergia: 0,85 < CI < 0,9: sinergia leve; 0,7 < CI < 0,85: sinergia moderada; 0,3 < CI < 0,7: sinergia; 0,1 < CI < 0,3: sinergia fuerte; 0,1 > CI: sinergia muy fuerte. CI calculados a partir de la media de las CI de tres experimentos independientes. Las líneas de puntos representan los límites de sinergia y del efecto aditivo.

Tabla 7. Viabilidad de CMSP tras un tratamiento de 24h con las diferentes combinaciones dendrímero/RTI. Se realizó en ensayo de MTS para evaluar la toxicidad de las distintas combinaciones. **(7.A)** Biocompatibilidad de las combinaciones dendrímero/AZT. **(7.B)** Toxicidad de la combinación G3-S16 o G2-NF16/EFV. **(7.C)** Viabilidad de la combinación dendrímero/TFV. Se estableció un 80% de viabilidad como límite de toxicidad para todas las condiciones. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

7.A

	[μ M]	G3-S16				G2-NF16		
		0	0,01	0,1	0,5	0,01	0,1	0,5
AZT	0	100 \pm 0,00	100,50 \pm 5,66	97,91 \pm 18,94	91,04 \pm 1,13	109,76 \pm 0,17	96,27 \pm 4,32	98,07 \pm 16,31
	0,01	97,83 \pm 4,64	104,61 \pm 17,57	112,35 \pm 12,55	87,89 \pm 9,92	90,22 \pm 0,65	102,98 \pm 13,66	95,91 \pm 10,52
	0,1	107,49 \pm 4,58	94,23 \pm 19,554	120,74 \pm 14,2	97,01 \pm 10,41	105,26 \pm 6,54	102,78 \pm 4,93	100,76 \pm 1,48
	0,5	113,56 \pm 13,69	117,63 \pm 8,31	116,74 \pm 33,69	103,06 \pm 8,25	110,64 \pm 18,86	111,24 \pm 3,8	102,17 \pm 5,16

7.B

	[μ M]	G3-S16				G2-NF16		
		0	0,01	0,1	1	0,01	0,1	1
EFV	0	100 \pm 0,00	106,09 \pm 7,4	116,08 \pm 13,34	102,49 \pm 14,48	111,99 \pm 11,53	104,49 \pm 0,97	110,36 \pm 11,58
	0,01	101,87 \pm 11,58	98,94 \pm 18,74	95,89 \pm 8,06	85,94 \pm 7,89	94,94 \pm 10,02	96,13 \pm 2,42	102,94 \pm 1,41
	0,1	89,03 \pm 1,5	94,98 \pm 5,08	92,38 \pm 0,2	88,01 \pm 2,99	100,85 \pm 8,39	93,39 \pm 2,37	93,66 \pm 19,34
	1	102,43 \pm 25,53	97,68 \pm 23,01	99,44 \pm 21,03	96,96 \pm 9,56	110,89 \pm 5,17	107,75 \pm 3,03	110,28 \pm 1,21

7.C

	[μ M]	G3-S16				G2-NF16		
		0	0,01	0,1	0,5	0,01	0,1	0,5
TFV	0	100 \pm 0,00	105,63 \pm 18,98	103,75 \pm 23,31	105,49 \pm 27,14	96,82 \pm 27,71	101,01 \pm 32,24	109,84 \pm 8,39
	0,01	104,93 \pm 11,24	102,67 \pm 15,94	91,76 \pm 17,87	93,97 \pm 32,21	103,17 \pm 22,55	95,59 \pm 31,58	103,11 \pm 6,01
	0,1	103,64 \pm 8,72	96,33 \pm 11,38	90,24 \pm 26,48	101,95 \pm 11,31	97,76 \pm 13,46	101,21 \pm 17,29	93,53 \pm 7,99
	0,5	95,77 \pm 12,88	89,56 \pm 11,84	101,21 \pm 16,21	95,91 \pm 23,15	102,86 \pm 17,87	101,05 \pm 17,94	97,59 \pm 3,55

Para analizar la actividad antiviral de cada uno de los compuestos en CMSP, de forma individual o en combinación, se determinó su EC_{50} , así como la EC_{50} de las distintas combinaciones entre los dendrímeros y los antirretrovirales AZT, EFV o TFV. En la mayoría de las combinaciones estudiadas se observó una notable reducción en los valores de la EC_{50} , en relación a la EC_{50} de los compuestos independientes, tanto frente a X4 VIH-1_{NL4.3} como a R5 VIH-1_{NL(AD8)} (Tablas 8-9). Así por ejemplo, G3-S16 y AZT de manera individual inhibieron al X4 VIH-1_{NL4.3} con una EC_{50} media de 0,632 μ M y 68nM, respectivamente (Tabla 8). La combinación G3-S16+AZT inhibió al X4 VIH-1_{NL4.3} con una EC_{50} media de 22nM, lo que se tradujo en una reducción de la EC_{50} de alrededor de 28,72 y 3,09 veces en comparación con sus EC_{50} individuales. En el caso de la infección por R5 VIH-1_{NL(AD8)} se observó también el mismo efecto. Con G3-S16 se obtuvo una inhibición del R5 VIH-1_{NL(AD8)} con una EC_{50} media de 0,856 μ M. Sin embargo, para la combinación G3-S16+AZT, se encontró una disminución de la EC_{50} de 40,76 y 1,81 veces en comparación con sus EC_{50} individuales. Así mismo, se encontraron reducciones de 57,06 y 16,8 veces, teniendo en cuenta sus EC_{50} individuales, para la combinación G3-S16+EFV (Tabla 8). Este mismo efecto se observó para el dendrímero G2-NF16. Se encontró una reducción de 4,46 y 174,6 veces en la EC_{50} de la combinación G2-NF16+AZT frente a X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} en comparación con la EC_{50} individual del G2-NF16 (Tabla 9). En resumen, estos datos muestran, en la mayoría de las combinaciones estudiadas, un incremento en la eficacia de estas

mezclas, medido como un descenso en la EC_{50} , respecto a la actividad de cada compuesto por separado. Además, las combinaciones de G3-S16 y G2-NF16 con cada uno de los ARV estudiados resultaron en un perfil inhibitorio más eficiente frente a la replicación el VIH en CMSP, medido como un descenso en la producción de antígeno p24^{agg}. Con el fin de evaluar el tipo de interacción de cada una de las mezclas dendrímero/ARV, se determinó el CI para cada una de estas combinaciones (Tablas 10-11). Se encontraron valores de sinergismo fuerte (valores de CI entre 0,46-0,49) o de efecto aditivo para las EC_{50} y EC_{75} de la combinación G3-S16+AZT frente a X4 y R5 VIH-1, respectivamente (Tabla 10). Además se observó un efecto aditivo de esta mezcla a la EC_{90} para el X4 VIH-1_{NL4.3}, pero no frente al R5 VIH-1_{NL(AD8)}. Perfiles con un efecto aditivo (valores de CI entre 0,92-0,95) o de sinergia fuerte (CI entre 0,34-0,45) fueron encontrados también para la combinación G3-S16+EFV frente a X4 y R5 VIH-1. A su vez, se encontraron interacciones del tipo sinergia moderada (CI=0,83) y sinergia fuerte (CI=0,51) a la EC_{90} para la combinación G3-S16+TFV frente a X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)}, aunque no se encontraron efectos sinérgicos a la EC_{50} frente a R5 VIH-1_{NL(AD8)} (Tabla 10).

Tabla 8. Valores de EC_{50} ($\mu M \pm SD$) de los compuestos G3-S16, AZT, EFV y TFV, solos o en combinación a los ratios equimolares (1:1), frente a X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} en CMSP primarias.

		EC_{50}^{Δ}		EC_{50} combinación ^o
		G3-S16	Inhibidor	
X4 VIH-1 _{NL4.3}	Zidovudina (AZT)	0.632 \pm 0.626	0.068 \pm 0.045	0.022 \pm 0.024 (*)
	Efavirenz		0.058 \pm 0.077	0.013 \pm 0.009 (*)
	Tenofovir		0.001 \pm 0.002	0.003 \pm 0.003
R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	Zidovudina(AZT)	0.856 \pm 0.757	0.038 \pm 0.014	0.021 \pm 0.017 (*)
	Efavirenz		0.252 \pm 0.403	0.015 \pm 0.001
	Tenofovir		0.006 \pm 0.002	0.003 \pm 0.002 (*)

^Δ Concentración a la cual el compuesto de forma individual produce un 50% de efecto inhibitorio frente a la infección por VIH-1 en CMSP.

^o Concentración efectiva 50 tras la combinación a ratio 1:1 de dos agentes antivirales. Los datos representan la media de tres donantes diferentes.

* $p < 0,05$ (análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis), comparado con el tratamiento individual.

Tabla 9. EC₅₀ (μM ± SD) de G2-NF16, AZT, EFV o TFV, de forma individual o en combinación a ratios equimolares (1:1), frente a X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} en CMSP primarias.

		EC ₅₀ ^Δ		EC ₅₀ combinación [○]
		G2-NF16	Inhibidor	
X4 VIH-1 _{NL4.3}	Zidovudina (AZT)	0.134 ± 0.05	0.068 ± 0.045	0.030 ± 0.029 (*)
	Efavirenz		0.058 ± 0.077	0.016 ± 0.004
	Tenofovir		0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.001 (*)
R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	Zidovudina (AZT)	6.634 ± 9.09	0.038 ± 0.014	0.038 ± 0.029
	Efavirenz		0.252 ± 0.403	0.024 ± 0.007 (*)
	Tenofovir		0.006 ± 0.002	0.001 ± 0.001 (*)

^Δ Concentración a la cual el compuesto de forma individual produce un 50% de efecto inhibitorio frente a la infección por VIH-1 en CMSP.

[○] Concentración efectiva 50 tras la combinación a ratio 1:1 de dos agentes antivirales. Los datos representan la media de tres donantes diferentes.

* p < 0,05 (análisis estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis), comparado con el tratamiento individual.

Tabla 10. Índices de combinación (CI ± SD) obtenidos a partir de diferentes combinaciones equimolares (1:1) entre G3-S16 y distintos RTI frente a la infección por X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} en CMSP.

		CI ^a		
Combinación	Virus	EC ₅₀	EC ₇₅	EC ₉₀
G3-S16/AZT	X4 VIH-1 _{NL4.3}	0.46 ± 0.39 (+++)	0.49 ± 0.52 (+++)	0.96 ± 1.38 (±)
G3-S16/AZT	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.97 ± 0.62 (±)	1.10 ± 1.11 (±)	ns
G3-S16/efavirenz	X4 VIH-1 _{NL4.3}	0.95 ± 0.37 (±)	0.93 ± 0.35 (±)	0.92 ± 0.33 (±)
G3-S16/efavirenz	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.45 ± 0.15 (+++)	0.39 ± 0.22 (+++)	0.34 ± 0.26 (+++)
G3-S16/tenofovir	X4 VIH-1 _{NL4.3}	0.73 ± 0.03 (++)	0.78 ± 0.11 (++)	0.83 ± 0.19 (++)
G3-S16/tenofovir	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	ns	0.95 ± 0.48 (±)	0.51 ± 0.18 (+++)

^a Índice de combinación (CI) calculado a nivel de la EC₅₀, EC₇₅ y EC₉₀. CI < 0,9 indica sinergismo; 0,9 < CI < 1,1 indica un efecto aditivo y CI > 1,1 indica ausencia de interacción positiva. ns = "no sinergia". Nivel de sinergia: 0,85 < CI < 0,9: sinergia leve (+); 0,7 < CI < 0,85: sinergia moderada (++); 0,3 < CI < 0,7: sinergia (+++); 0,1 < CI < 0,3: sinergia fuerte (++++); 0,1 > CI: sinergia muy fuerte (+++++).

Se usaron rangos de concentración equimolares dendrímero /ARV de entre 0,01 μM y 1 μM. Cada experimento se realizó por duplicado. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

De igual manera, interacciones de tipo sinérgico o aditivo se encontraron para todas las EC_{50} , EC_{75} y EC_{90} observadas en las combinaciones entre G2-NF16 y AZT, EFV o TFV frente a ambos tipos virales (Tabla 11), con la excepción de la combinación G2-NF16/EFV a su EC_{50} frente al X4 VIH-1_{NL4.3}. Es importante destacar cómo, a las EC_{50} , EC_{75} y EC_{90} obtenidas, se encontraron perfiles de sinergia fuerte o muy fuerte (CI entre 0,01-0,31) para la combinación de G2-NF16+TFV frente a X4 y R5 VIH-1.

La actividad antiviral de estas combinaciones dendrímeros/RTI se estudió, además, frente a un aislado primario del VIH-1 del subtipo C con tropismo R5, que es uno de los subtipos virales más prevalentes. (Tabla 12). Estos estudios mostraron un perfil sinérgico (valores de CI entre 0,012-0,54) a las EC_{90} para todas las combinaciones, con la excepción de la combinación G3-S16/TFV, demostrando la mayor efectividad de estas mezclas entre dendrímeros carbosilanos y RTI, no solo frente a aislados de laboratorio, sino también frente a aislados primarios del VIH. De esta forma se confirman los datos obtenidos previamente en la línea celular TZM.bl.

Tabla 11. Sinergia e índices de combinación (CI \pm SD) para diferentes combinaciones de ARV (AZT, EFV o TFV) y el dendrímero G2-NF16 a ratios equimolares (1:1) frente a la infección por X4 VIH-1_{NL4.3} y R5 VIH-1_{NL(AD8)} en CMSP.

Combinación	Virus	CI ^a		
		EC_{50}	EC_{75}	EC_{90}
G2-NF16/AZT	X4 VIH-1 _{NL4.3}	0.63 \pm 0.45 (+++)	0.55 \pm 0.29 (+++)	0.70 \pm 0.51 (++)
G2-NF16/AZT	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.84 \pm 0.37 (+)	0.45 \pm 0.45 (+++)	0.30 \pm 0.38 (+++)
G2-NF16/efavirenz	X4 VIH-1 _{NL4.3}	ns	0.99 \pm 0.14 (\pm)	0.81 \pm 0.41 (++)
G2-NF16/efavirenz	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.91 \pm 0.48 (\pm)	0.71 \pm 0.45 (++)	0.59 \pm 0.48 (+++)
G2-NF16/tenofovir	X4 VIH-1 _{NL4.3}	0.01 \pm 0.01 (+++++)	0.01 \pm 0.01 (+++++)	0.01 \pm 0.01 (+++++)
G2-NF16/tenofovir	R5 VIH-1 _{NL(AD8)}	0.16 \pm 0.12 (+++++)	0.22 \pm 0.13 (+++++)	0.31 \pm 0.15 (+++)

^a Índice de combinación (CI) calculado a nivel de la EC_{50} , EC_{75} y EC_{90} . $CI < 0,9$ indica sinergismo; $0,9 < CI < 1,1$ indica un efecto aditivo y $CI > 1,1$ indica ausencia de interacción positiva. ns = “no sinergia”. Nivel de sinergia: $0,85 < CI < 0,9$: sinergia leve (+); $0,7 < CI < 0,85$: sinergia moderada (++); $0,3 < CI < 0,7$: sinergia (+++); $0,1 < CI < 0,3$: sinergia fuerte (++++); $0,1 > CI$: sinergia muy fuerte (+++++).

Se usaron rangos de concentración equimolares dendrímero /ARV de entre 0,01 μ M y 1 μ M. Cada experimento se realizó por duplicado. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Tabla 12. Sinergia e índices de combinación (CI) de la mezcla de distintos RTI (AZT, EFV o TFV) con los dendrímeros carbosilanos en combinaciones equimolares a ratio (1:1) frente a un aislado primario del VIH-1 subtipo C en CMSP.

Combinación	CI ^a	
	EC ₇₅	EC ₉₀
G3-S16/AZT	0.431 (+++)	0.387 (+++)
G2-NF16/AZT	0.506 (+++)	0.182 (++++)
G3-S16/EFV	0.479 (+++)	0.288 (+++)
G2-NF16/EFV	1.028 (±)	0.547 (+++)
G3-S16/TFV	0.001 (+++++)	ns
G2-NF16/TFV	ns	0.012 (+++++)

^a Índice de combinación (CI) calculado a nivel de la EC₅₀, EC₇₅ y EC₉₀. CI<0,9 indica sinergismo; 0,9<CI<1,1 indica un efecto aditivo y CI>1,1 indica ausencia de interacción positiva. ns = “no sinergia”. Nivel de sinergia: 0,85<CI<0,9: sinergia leve (+); 0,7<CI<0,85: sinergia moderada (++); 0,3<CI<0,7: sinergia (+++); 0,1<CI<0,3: sinergia fuerte (++++); 0,1>CI: sinergia muy fuerte (+++++).

Se usaron rangos de concentraciones equimolares dendrímero /ARV de entre 0,01µM y 1µM. Datos procedentes de un único experimento. Cada condición se testó por triplicado.

Las investigaciones recogidas en esta segunda parte de los resultados han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Vacas-Córdoba E., Arnaiz E., Relloso M. Sánchez-Torres C., García F., Pérez-Álvarez L., Gómez R., de la Mata FJ., Pion M., Muñoz-Fernández MA. **Development of sulphated and naphthylsulfonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission.** *AIDS*. 2013 May 15;27(8):1219-29 (I.F.: 6,407)

Vacas-Córdoba E., Arnáiz E., De La Mata FJ., Gómez R., Leal M., Pion M., Muñoz-Fernández MA. **Synergistic activity of carbosilane dendrimers in combination with maraviroc against HIV in vitro.** *AIDS*. 2013 Apr 26. (I.F.: 6,407)

Vacas-Córdoba E., Arnaiz E., Gómez R., de la Mata FJ., Pion M., Muñoz-Fernández MA. **Synergistic activity of carbosilane dendrimers in combination with reverse transcriptase inhibitor drugs against HIV: searching for more potent microbicides.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (En revisión) (I.F.: 4,565)

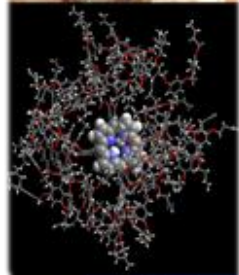
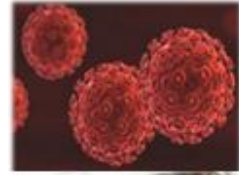
Vacas-Córdoba E., Arnaiz E., de la Mata FJ., Gómez R., Pion M., Muñoz-Fernández MA. **Mechanism of action of carbosilane dendrimers against HIV infection.** (En proceso de escritura)

Arnáiz E.[#], **Vacas-Córdoba E.**[#], Galán M., Pion M., Gómez R., Muñoz-Fernández MA., de la Mata FJ. **Synthesis of anionic carbosilane dendrimers via click chemistry and their antiviral properties against HIV.** *Journal of Polymer Chemistry* (Sometido) ([#]=coautores) (I.F.: 3,543)

DISCUSIÓN

5

UNAIDS | 2011-2015 STRATEGY
GETTING TO ZERO



DISCUSIÓN

A-GLICODENDRÍMEROS Y DENDRÍMEROS DERIVADOS DEL FÓSFORO COMO VECTORES NO VIRALES EN INMUNOTERAPIAS FRENTE AL VIH BASADAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

El objetivo de estudio fue evaluar la potencial actividad de dos grupos de nanopartículas: glicodendrimeros decorados con maltosa y fosfordendrimeros, como transportadores de antígenos virales, en este caso péptidos, para su utilización en inmunoterapias basadas en CD frente al VIH-1. Esta actividad ya se demostró previamente utilizando dendrimeros catiónicos de naturaleza carbosilano²¹¹.

Se analizaron cuatro glicodendrimeros diferentes: el compuesto neutro DS-PPIg4 y los dendrimeros catiónicos OS-PPIg4, DS-PPIg4-3(NH₂) y DS-PPIg4-6(NH₂), y tres fosfordendrimeros cargados positivamente de diferentes generaciones: G₂-NH⁺, G₃-NH⁺ y julo-G₄-NH⁺. Al mismo tiempo, se estudiaron tres péptidos aniónicos derivados del VIH, diferentes en tamaño y carga, con el fin de determinar las mejores combinaciones para incrementar la captura de estos péptidos en CD, y la estimulación de las células. En el caso de los glicodendrimeros, el dendrimero neutro DS-PPIg4 presenta una arquitectura en la que su superficie se encuentra densamente recubierta con maltosas, por lo que la formación de complejos con los péptidos únicamente se debe a la participación de enlaces de hidrógeno (H)^{189,199}. Este dendrimero, a diferencia del resto de glicodendrimeros, únicamente interaccionó con el péptido P24. Estas diferencias de interacción se deben a que P24 tiene en su estructura un alto número de aminoácidos hidrofílicos y una secuencia corta, lo que favorece el establecimiento potencial de enlaces de H. Por otro lado, los glicodendrimeros DS-PPIg4-3(NH₂) y DS-PPIg4-6(NH₂), presentan una superficie en la que se combinan unidades de maltosa con grupos salientes catiónicos de tipo amino aleatoriamente distribuidos. Esto permite que estos glicodendrimeros, junto con el OS-PPIg4, formen complejos con los péptidos, en los que participan, no solo enlaces por puentes de H, sino también interacciones electrostáticas, favoreciendo una formación más efectiva de los dendriplexes, como se demostró experimentalmente. En el caso de los fosfordendrimeros, los tres candidatos formaron complejos con los péptidos analizados, debido principalmente al establecimiento de interacciones electrostáticas, aunque no se puede descartar la participación de otro tipo de fuerzas moleculares.

Respecto a la entrada antigénica, sólo los glicodendrimeros catiónicos incrementaron la captura del péptido P24 en CDi, donde más del 80% de las células fueron positivas para el péptido tras 2h de incubación con el mismo. Este mismo efecto también se encontró para los fosfordendrimeros, siendo el compuesto G₃-NH⁺ el que tuvo mejor capacidad de internalización. Sin embargo, la capacidad de carga de los péptidos en las CD no estuvo relacionada con la cantidad de cargas de los distintos fosfordendrimeros lo que sugiere la posible participación de otro tipo de interacciones, a parte de las electrostáticas, en la formación de los complejos dendrimero-péptido. Estos datos confirman el potencial de estos grupos de dendrimeros para el transporte y liberación de biomoléculas cargadas en células primarias, sugiriendo una posible aplicación como agentes transfectantes no virales. En otros trabajos previos ya se ha descrito la habilidad de nanopartículas

cargadas y funcionalizadas con azúcares o disacáridos para incrementar la captura intracelular de ácidos nucleicos o péptidos en células presentadoras de antígeno vía receptores de endocitosis con una baja toxicidad²³¹⁻²³⁵.

Las CD se caracterizan por una alta plasticidad lo que les permite desencadenar un amplio repertorio de respuestas inmunes que van desde potentes respuestas celulares y humorales específicas hasta el desarrollo de respuestas tolerogénicas o incluso de anergia, en caso de una inadecuada activación y maduración de las mismas⁷⁸. La maduración de las CD es esencial para su correcta migración hacia los nódulos linfáticos y la presentación antigénica a las células T²³⁶. Aunque ninguno de los glicodendrimeros o fosforodendrimeros impidió la maduración de las CD, los glicodendrimeros catiónicos y los fosforodendrimeros de tercera y cuarta generación (G3 y G4) indujeron cambios importantes en el fenotipo de estas células que podrían afectar a sus funciones. Aunque el fosforodendrimer G₂-NH⁺ y sus complejos no modificaron la expresión de los marcadores CD80, CD83 y CD86 en CD, sí que modificaron las propiedades migratorias de las CD, alterando su capacidad de estimulación de las células T *in vitro* y disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-8 y el TNF α .

En el caso de los glicodendrimeros, estos compuestos indujeron un estado de activación de las CD. Esta activación inducida por el tratamiento con las nanopartículas podría deberse a la presencia de maltosas en la superficie de los glicodendrimeros o a la carga neta de estos compuestos. En general, la maltosa no se considera un activador del sistema inmune, aunque algunos estudios han demostrado la actividad inmunoestimuladora de agregados de maltosa o compuestos maltosilados^{232,235,237}. Experimentos previos *in vivo* con poli(etileniminas) (PEI) maltosiladas demostraron diferencias en la toxicidad y la capacidad de transfección en función del tipo de grupos, maltosas o maltotriosas, acoplados a esas nanopartículas^{238,239}. En base a estos estudios *in vivo*, se puede hipotetizar que la alta cantidad de maltosas presentes en la superficie de los glicodendrimeros podría explicar la estimulación de las CD al interactuar con diferentes marcadores de superficie de estas células. Sin embargo, el dendrimer neutro DS-PPIg4 no produjo cambios en el fenotipo de las CD. Esto podría deberse a que la alta densidad de maltosas (64 unidades) de su superficie impediría su reconocimiento por parte de las moléculas de superficie de las CD, como DC-SIGN, cuyos bolsillos de reconocimiento únicamente pueden albergar dos unidades de maltosa. Esto no sucede con los otros glicodendrimeros debido a que la disposición de las maltosas sobre su esqueleto PPI es menos compacta, lo que aumenta su reconocimiento por las moléculas de DC-SIGN de la superficie de las CD. Sin embargo, no se puede descartar que la activación de las CD se deba a la carga de los dendrimeros como se demostró con el uso de micropartículas polianhídricas²⁴⁰. El desarrollo de procesos de modelaje molecular ayudaría a esclarecer el papel de la estructura y la arquitectura de estos glicodendrimeros en la estimulación de las CD.

Se ha descrito el uso de nanopartículas funcionalizadas con azúcares para la estimulación de CD²³¹. Esto se asocia a una mayor sensibilización de las CD, que conduce a una mejor presentación antigénica y a un incremento de la magnitud de la respuesta inmune.

Sin embargo, no se encontró en experimentos *ex vivo* de co-cultivo autólogo una mejor estimulación inmune, medida como proliferación de células T, asociada al incremento de captura

antigénica por parte de las CD. Esto puede ser debido a diferentes causas, como el bajo número de péptidos utilizados, el tamaño de los péptidos, el desconocimiento de su vía de procesamiento y presentación vía MHC I ó II, o la ausencia de clones de células T reactivos frente a los péptidos usados en las muestras empleadas. Algunas estrategias para mejorar e incrementar la estimulación inmune serían el empleo de mezclas de múltiples péptidos inmunogénicos del VIH que abarcaran diferentes epítomos virales⁸².

En el caso de los fosforodendrimeros, los cambios producidos en las CD tras su tratamiento con estos compuestos podrían tener un impacto a nivel de la respuesta inmune, así como en un adecuado balance Th1/Th2. La pérdida por parte de las CD de su capacidad migratoria, así como su capacidad para producir un efecto inflamatorio (debido a la supresión de la producción de TNF- α), podría inducir tolerancia a nivel local, descartando a estos compuestos para su uso en inmunovacunas frente al VIH. Sin embargo, algunos estudios basados en desentrañar la complejidad de las diferentes poblaciones de CD han demostrado el posible papel de estas células en estrategias terapéuticas orientadas hacia una inducción de tolerancia^{241,242}. El empleo de CD tolerogénicas ha sido efectivo en modelos experimentales de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD- Graft-Versus-Host-Disease)²⁴¹ o en estudios de diabetes tipo I en humanos^{243,244}. Además, se han probado previamente otros tipos de nanopartículas en la inducción oral de tolerancia para el desarrollo de vacunas, como por ejemplo, nanopartículas de quitosán transportando ADN que codifica para determinados antígenos²⁴⁵. Con estas nanopartículas se ha conseguido inducir tolerancia y su transferencia desde donantes a receptores vírgenes en modelos *in vivo* de ratón.

Con esta perspectiva, la inducción de un perfil tolerogénico en las CD tratadas con los fosforodendrimeros, sugiere al menos otros posibles usos terapéuticos de este tipo de compuestos como podrían ser: i) su uso como agentes tópicos antiinflamatorios debido al descenso en citoquinas proinflamatorias inducido por G₂-NH⁺, ii) su empleo en procesos de alotransplantes o enfermedades autoinmunes como fuente de tolerancia inmune o iii) su uso como transportadores de antígenos para la inducción de tolerancia específica en algunos tipos de reacciones alérgicas. Todas estas nuevas vías de aplicación deberán ser exploradas en el futuro para confirmar o desechar la potencialidad de estos compuestos como inductores de tolerancia.

En la mayoría de las investigaciones, las CD reguladoras se preparan habitualmente mediante su cultivo en presencia de moléculas inmunosupresoras como IL-10 u otros compuestos como el ligando del receptor de la vitamina D o la galectina-1^{246,247}. Sin embargo, en esta Memoria, se observa un ligero descenso en la producción de IL-10 cuando las CD se tratan con los fosforodendrimeros. Por tanto, se deberá evaluar cuidadosamente en el futuro el mecanismo a través del cual estos dendrimeros son capaces de inducir tolerancia, así como su bioseguridad. Además, también resultaría interesante profundizar en el estudio de como la función de estas células tolerogénicas se mantiene en el microambiente inmune, a pesar de sus interacciones regulatorias con otros tipos y poblaciones celulares²⁴⁸.

Además, el uso de dendrímeros marcados fluorescentemente, como el jul- G₄-NH⁺, abre las puertas a estas nanopartículas a nuevas áreas de aplicación como por ejemplo en técnicas de imagen y monitorización *in vivo*.

	Glicodendrimeros	Fosforodendrimeros
Captura peptídica	↑ ↑	↑
Fenotipo	↑	↑
Maduración	=	=
Estimulación células T	=	↓
Migración	=	↓
Citoquinas	TNF-α ↑ IL-10 = (↓)	TNF-α ↓ IL10 ↓

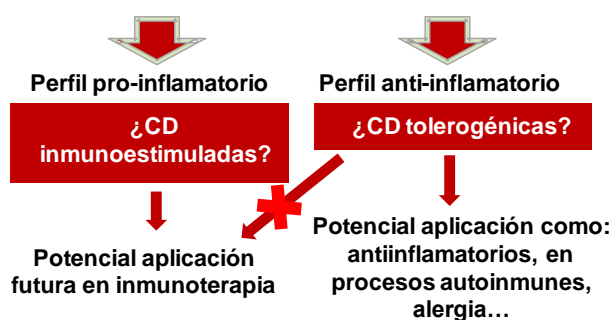


Tabla 13. Principales efectos de los glicodendrimeros y los fosforodendrimeros sobre las características y funciones de las CD y perspectivas futuras.

Por tanto, y en base a los resultados presentados, solo los glicodendrimeros catiónicos parecen ser candidatos óptimos con los que continuar un futuro desarrollo en esta línea (Tabla 13). Sería interesante evaluar el significado biológico de la activación de las CD asociada a los glicodendrimeros en sistemas *in vivo*, así como, el potencial adyuvante e inmunoestimulador de los complejos glicodendrimeropéptido en estrategias de vacunación frente al VIH basadas en CD en modelos *in vivo*, como ratones humanizados o macacos (Fig. 61). Además parece crucial la preparación y estudio de mezclas de péptidos más inmunogénicas con los que cargar a las CD y que permitan mejorar la activación de la respuesta inmune.

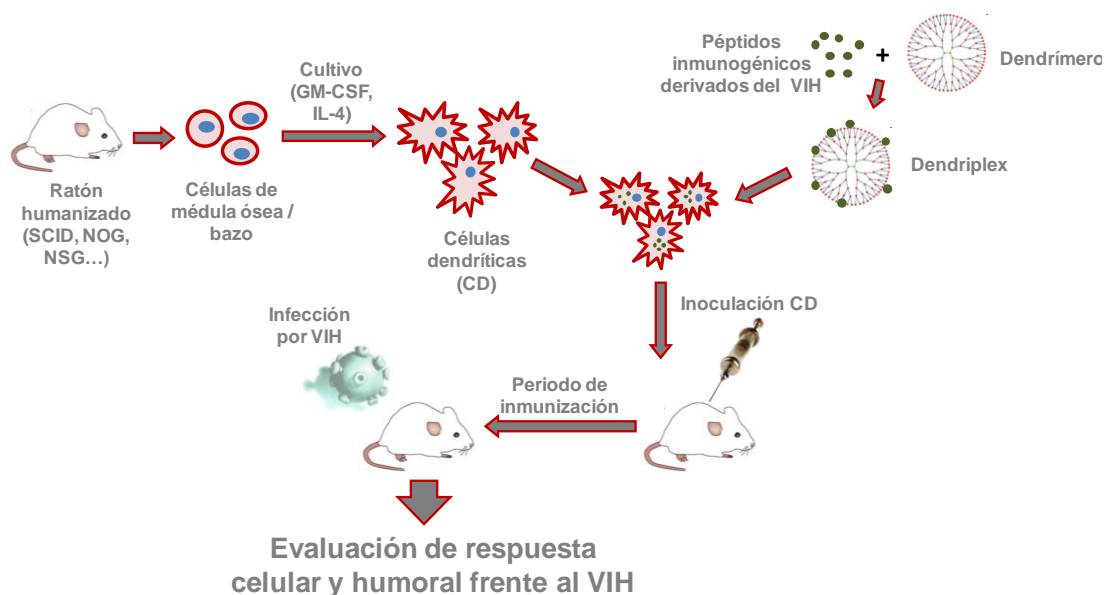


Figura 61. Modelo *in vivo* para el estudio del uso de dendrímeros como transportadores de moléculas antigénicas en inmunoterapias frente al VIH

Además, en los últimos años se ha demostrado el papel de los glicodendrímeros y de otras nanopartículas recubiertas con azúcares como agentes con actividad antiviral²⁴⁹. Estas moléculas podrían competir con virus y otros patógenos por los receptores de azúcares de la superficie de las células diana, bloqueándolos y disminuyendo la infección de las mismas. Por ello, también sería de interés analizar la actividad antiviral de estos glicodendrímeros de estructura PPI decorados con maltosas como microbicidas frente a diferentes patógenos como el VIH.

B- DENDRÍMEROS CARBOSILANOS COMO MICROBICIDAS FRENTE AL VIH

A pesar del descenso de 3,2 millones en el número de nuevas infecciones en 2011 respecto al año 2001, aún son 2,5 los millones de personas que se infectan anualmente por el VIH¹. La transmisión sexual es responsable de más de un 80% de estas nuevas infecciones y continúa siendo una de las rutas de transmisión más difíciles de abordar. Desde hace más de veinte años se ha establecido la idea de desarrollar nuevas estrategias preventivas para frenar la infección por el VIH, especialmente en mujeres, como son el uso de microbicidas tópicos de uso vaginal^{187,94,116,250}. Diversas investigaciones se han centrado en el estudio de los dendrímeros como microbicidas no específicos y se han obtenido ya los primeros resultados positivos en ensayos clínicos en humanos²⁵¹. Es el caso del SPL7013, un dendrímeros polianiónico funcionalizado con 32 grupos naftalensulfonato terminales que ha llegado a fase II^{137,178}.

Los dendrímeros de tipo carbosilano son compuestos estables y la capacidad microbicida de algunos miembros de esta familia ya ha sido previamente descrita¹⁸². A lo largo de este trabajo se han estudiado dos nuevos tipos de dendrímeros polianiónicos carbosilanos, G3-S16 y G2-NF16, con grupos de tipo sulfato y naftilsulfonato en su periferia, respectivamente. Estos compuestos se eligieron tras un cribado inicial de más de 10 compuestos, pertenecientes a diferentes familias. Con el fin de

determinar y caracterizar su potencial uso como microbicidas, se ha evaluado su bioseguridad en diferentes tipos celulares, así como su efectividad inhibiendo la transmisión del VIH y la infección viral.

Está descrito que en la transmisión heterosexual del VIH-1, los virus de tropismo R5 son principalmente los dominantes y los implicados en las primeras etapas de la infección²⁵². Sin embargo, también se han encontrado variantes del VIH de tipo X4 presentes en el semen, aunque se desconoce su papel en estos primeros pasos de la infección por vía sexual²⁵³. Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 inhibieron la transmisión de células infectadas por el VIH de tropismo R5 a través de monocapas de células epiteliales *in vitro*, así como la internalización de partículas virales en el interior de estas células. Además, mostraron su capacidad para mantener y proteger la integridad de estas monocapas, pues se ha descrito que la exposición directa de las células de la mucosa del epitelio genital al VIH conduce a la desorganización de esta barrera por el contacto directo entre las células epiteliales y la gp120 del VIH, lo que incrementa el paso de partículas virales a través del epitelio²²⁴. Ambos dendrímeros mostraron también una alta capacidad inhibitoria en CMSP de aislados X4 VIH-1 y diferentes subtipos primarios de VIH-1 de tropismo R5.

Los inhibidores polianiónicos del VIH se consideran tradicionalmente inhibidores de la entrada y su mecanismo de acción se asocia con el establecimiento de interacciones de tipo electrostático entre la gp120 viral y diferentes grupos funcionales de la periferia de estos compuestos^{102,182}. A pesar de resultados preliminares utilizando técnicas de modelaje molecular en el caso del dendrímero carbosilano 2G-S16¹⁸², en este trabajo se ha esclarecido por primera vez el mecanismo por el cual estos dendrímeros producirían su efecto inhibitorio sobre la infección de las células diana. Los dendrímeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 son capaces de inhibir la infección a nivel de la fusión y entrada viral. Estos compuestos impiden la unión de las partículas virales a la superficie de las células diana y la fusión de membranas, sugiriendo un bloqueo de la interacción gp120/CD4. Esta unión a la gp120 sería además la responsable del mecanismo protector frente a la disrupción de la monocapa descrito anteriormente. Los dendrímeros también son capaces de bloquear la entrada viral en células epiteliales y en células primarias, a excepción del virus R5 VIH-1_{NL(AD8)} en CMSP. Sin embargo, los dendrímeros se han mostrado altamente efectivos inhibiendo aislados VIH-1 R5. Estos datos sugieren la hipótesis de que aunque las partículas de VIH de los aislados VIH-1 R5 entran en el interior de las CMSP, éstas se encuentran bloqueadas por los dendrímeros y confinadas en determinados compartimentos intracelulares como los endosomas, lo que también podría estar en relación con la reducción observada en la fusión de membranas. Se deben realizar nuevos experimentos para comprobar esta hipótesis.

Los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 son compuestos polianiónicos de tipo inespecífico y al igual que otros miembros de su familia, su mecanismo de acción se asocia a interacciones electrostáticas entre sus grupos aniónicos y regiones catiónicas de proteínas de la envuelta viral, como la región V3 de la gp120, lo que impediría la unión del virus a las células. Sin embargo, en este trabajo se ha demostrado que los dendrímeros pueden unirse a distintas moléculas de la superficie de las células diana implicadas en el proceso de infección como el receptor CD4 o el correceptor CCR5. Además, y por primera vez, se ha demostrado como los dendrímeros inhiben la transmisión del VIH de célula a célula y dificultan la formación de la sinapsis infecciosa. Se deben realizar más experimentos para determinar a qué moléculas se unen los dendrímeros en su efecto inhibitorio sobre la sinapsis

virológica. Sin embargo, y debido a su carácter cargado, los dendrímeros podrían unirse inespecíficamente a distintas moléculas implicadas en la formación de la sinapsis virológica como siglec-1, ICAM-1 o LFA-1²⁵⁴⁻²⁵⁶. Tampoco es descartable que, durante el proceso de sinapsis, los dendrímeros pudieran unirse a los *lipid raft*, modificando la fluidez de membrana o tuvieran un efecto sobre los movimientos y polarización del citoesqueleto, al unirse a proteínas como la actina o la miosina. Sin embargo, se ha demostrado que el efecto inhibitorio de la transmisión viral célula-célula mediado por los dendrímeros es independiente de DC-SIGN. No se encontraron diferencias en el proceso de infección en “*trans*” por el VIH cuando se utilizaron células Raji, que expresasen o no DC-SIGN en la membrana celular. Esta molécula de adhesión, del tipo C-lectina, se expresa en CD y se requiere para la estabilización de la sinapsis entre la CD y la célula T a través de su unión de alta afinidad a ICAM-3 en la membrana de las células T²⁵⁷⁻²⁵⁹.

También se encontraron diferencias en la distribución de las partículas virales en el interior de las CD durante el proceso de transmisión viral. Cuando se trataron las CD con los dendrímeros, la mayoría de ellas contenían el virus en una distribución difusa a lo largo del citoplasma. Por otra parte, cuando el tratamiento se realizó en las células receptoras, la mayoría de las CD presentaban el VIH contenido en el interior de compartimentos intracelulares de tipo “saco”. Esto permite hipotetizar sobre diferentes mecanismos de acción de los dendrímeros en cada uno de los casos. Cuando se tratan las CD que llevan los virus, los dendrímeros podrían inhibir el desplazamiento de las partículas virales desde su entrada hacia la región polarizada o hacia el compartimento intracelular descrito originado por una invaginación de la membrana de la CD, por lo que los virus presentarían una distribución difusa. Sin embargo, cuando se tratan las células receptoras, las partículas de VIH se encuentran principalmente agrupadas en el interior de estos compartimentos intracelulares no pudiendo ser reclutadas hacia la región de la sinapsis virológica. Esto podría ocurrir por un bloqueo por parte de los dendrímeros de las interacciones específicas entre proteínas en el área de contacto entre células, lo que impediría el desencadenamiento de las señales adecuadas para la formación de la sinapsis virológica. Por tanto, el modelo sugerido de acción de estos dendrímeros sería un mecanismo multifactorial e inespecífico en el que estarían implicadas diferentes proteínas, tanto a nivel viral como a nivel de la superficie de la célula diana (Fig. 62).

Estos dendrímeros carbosilanos polianiónicos son buenos candidatos a microbicidas debido a que reducen la infección de un amplio abanico de aislados de VIH-1, además de a otros patógenos de transmisión sexual como el VHS-2. El VHS-2 o herpes genital es un virus de transmisión sexual que afecta alrededor de 500 millones de personas en el mundo y es un importante co-factor en la transmisión del VIH²⁶⁰. De este modo, las personas infectadas por el VHS-2 tienen tres veces más riesgo de infectarse por el VIH-1. De ahí la importancia de desarrollar microbicidas que tengan un amplio espectro de actuación. Se están realizando nuevos ensayos con el objetivo de conocer el mecanismo por el que estos dendrímeros producen la inhibición del VHS-2 y otros virus relacionados con la infección por el VIH, como el virus de la hepatitis C (VHC).

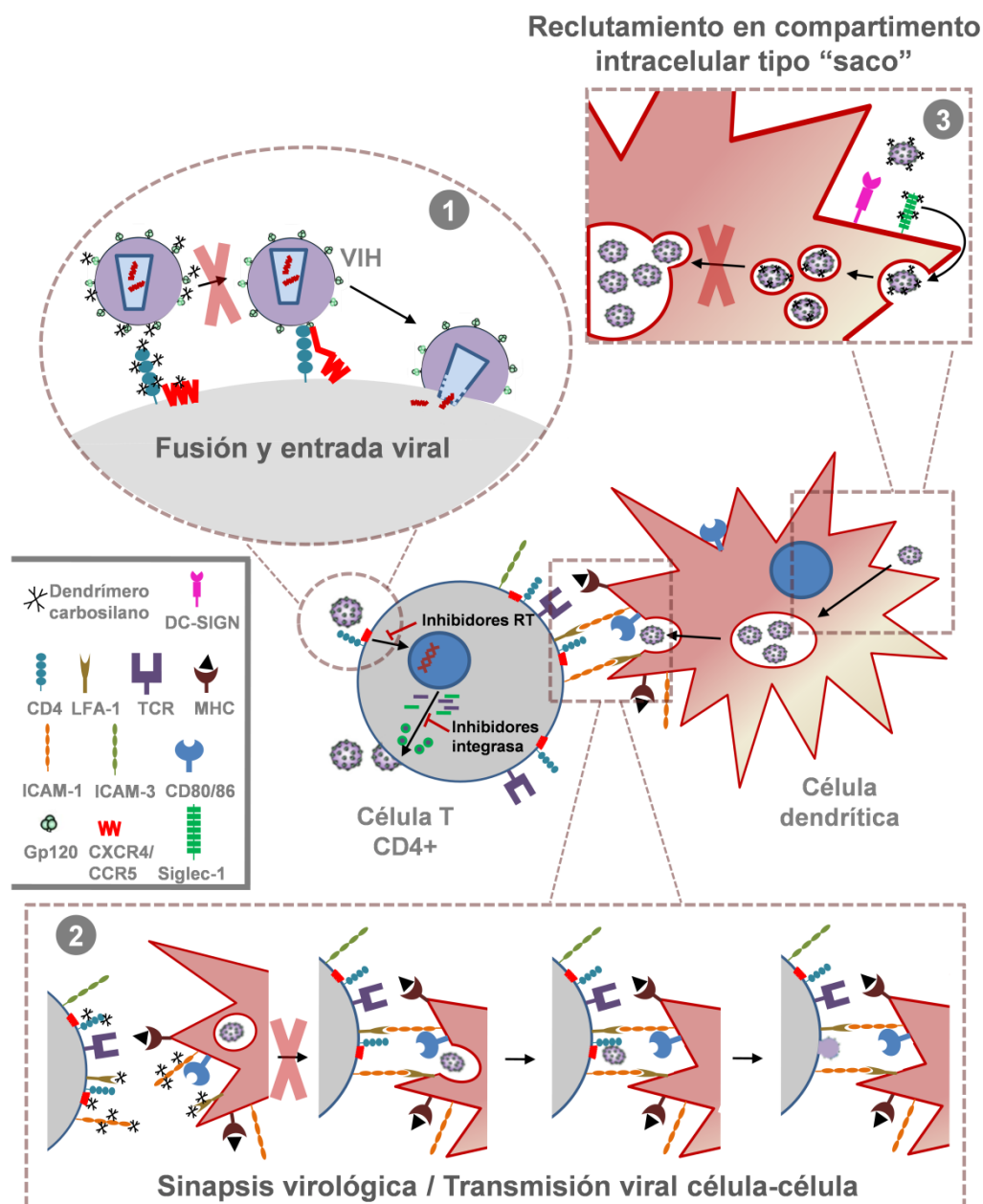


Figura. 62. Modelo del mecanismo de acción de los dendrímeros carboxilanos aniónicos. Los dendrímeros impiden la fusión entre proteínas de la envuelta viral y proteínas de la membrana (1). Además dificultan la formación de la sinapsis virológica (2) y el reclutamiento de las partículas virales en el compartimento intracelular de las CD (3) debido a su posible interacción inespecífica con diferentes moléculas de superficie.

Debido a que los dendrímeros juegan un papel inhibitorio a nivel de los primeros pasos de la infección viral, sus combinaciones con otros compuestos antivirales que actúen en otros puntos del ciclo viral como inhibidores de la RT o de la integrasa podrían ser interesantes a la hora de generar nuevos compuestos microbicidas^{144,261}. Esto, unido a que el uso de ARV de manera individual no está mostrando los efectos deseados como microbicidas en los distintos ensayos clínicos, y que podría asociarse con incrementos en la transmisión de aislados virales resistentes, conduce a la búsqueda y desarrollo de nuevas estrategias de combinación como una herramienta imprescindible para la prevención de la infección por el VIH.

La combinación de dos o más compuestos ya se ha probado previamente con éxito en el tratamiento de otras patologías como el cáncer o enfermedades infecciosas^{262,263}. En esta Memoria se ha demostrado como la combinación de los dendrímeros G3-S16 y G2-NF16 con el antagonista del correceptor CCR5, MVC, presenta un perfil inhibitorio sinérgico o aditivo frente a las infecciones por aislados R5 VIH-1 y X4/R5 VIH-1. Este hecho es especialmente relevante debido a que la primo-infección ocurre principalmente por aislados R5, así como por la creciente utilización clínica de este fármaco y por su efecto inmunomodulador además de antirretroviral. El mismo efecto también se ha encontrado cuando los dendrímeros se combinaron con otro tipo de ARV como por ejemplo con inhibidores de la RT como el AZT, el EFV o el TFV frente a aislados virales de tipo R5 ó X4 en líneas celulares y células primarias.

La combinación de compuestos que tienen sus dianas de actuación en distintos puntos del ciclo del VIH-1 permite incrementar la potencia individual de cada uno de los compuestos, explicando así el tipo de sinergias e interacciones observadas. Esto reduce también el riesgo de transmisión y aparición de aislados con nuevas resistencias, debido a que la combinación de agentes que consiguen un mismo efecto a través de distintos mecanismos dificulta la aparición de resistencias debido a mutaciones simples de estos patógenos, y en caso de que éstas aparezcan, su impacto sobre el resultado terapéutico de estos compuestos es menor. Además, estas estrategias combinatorias permiten el uso de menores cantidades de cada uno de los ARV, lo que se traduce en una menor toxicidad y efectos secundarios asociados a estos fármacos. Este hecho también tiene una importante repercusión económica. El uso de concentraciones más pequeñas de producto permite tener menores gastos de producción y, por tanto, disminuir el coste final de los microbicidas en el momento de su comercialización y llegada a los consumidores. Este hecho es especialmente importante en el uso de los microbicidas para la prevención de la infección por el VIH, ya que su principal mercado son los países en vías de desarrollo, países en los que se combinan las mayores prevalencias de la enfermedad con unas economías pobres y de bajísimas renta per cápita.

Sería de interés la realización de nuevos experimentos en los que se evalúen la actividad antiviral de estas combinaciones de dendrímero/ARV frente a otros subtipos virales del VIH-1 u otros patógenos de transmisión sexual como el VHS-2 o VHC, así como estudios que permitan desentrañar y comprender los mecanismos subyacentes a las interacciones de tipo sinérgico y aditivo observadas.

En los últimos años, de todos los ensayos clínicos relacionados con la actividad de microbicidas de uso tópico, sólo el CAPRISA 004 ha mostrado resultados positivos en humanos^{87,117}. Además, en algunos casos, como el de la celulosa sulfato, se han descrito efectos nocivos de estos compuestos asociados a una mayor infección por el VIH debido a la inducción de inflamación local o a la irritación del entorno vaginal²⁶⁴. En este estudio, se demuestra como el tratamiento de células epiteliales con los dendrímeros G3-S16 o G2-NF16 no produce cambios en la producción de citoquinas proinflamatorias, en la proliferación celular, en la microbiota vaginal o en la supervivencia espermática. Así mismo, tampoco se encontraron lesiones o procesos inflamatorios asociados al tratamiento por vía vaginal de ratones CD1(ICR) con estos compuestos, mostrando su seguridad *in vitro* e *in vivo*.

A pesar del éxito de muchos candidatos a microbicidas en las evaluaciones preclínicas, muchos de ellos han fracasado en ensayos realizados posteriormente en humanos. Por tanto, parece

esencial aprender de errores pasados y comenzar a evaluar a estos compuestos desde sus fases más tempranas en unas condiciones lo más cercanas posibles a las condiciones fisiológicas en los momentos de la primo-infección por el VIH-1. Esto incluiría el estudio del impacto de estos compuestos sobre los fluidos vaginales y rectales, las relaciones inmunológicas a nivel de la mucosa, o el efecto inflamatorio de estos compuestos sobre las mucosas vaginales como consecuencia de una aplicación repetida de los mismos⁹³. Todos estos parámetros deberán ser evaluados para estos dendrímeros en el futuro.

Resumiendo, todos los datos recogidos en esta Memoria indican el enorme potencial de estos compuestos y sus combinaciones como microbicidas para su aplicación frente al VIH. Sin embargo, todos los ensayos, a excepción de las pruebas de seguridad realizadas en ratones, se han hecho *in vitro*. Parece clave dar el salto a modelos *in vivo* que permitan confirmar la actividad inhibidora de estos dendrímeros y su seguridad. Para ello, sería de gran interés probar estos compuestos en modelos animales como ratones humanizados o macacos susceptibles de ser infectados por el VIH.

Es interesante puntualizar que también la vía de transmisión homosexual, es una de las principales fuentes de contagio e infección por el VIH. Por ello, es crucial el estudio del comportamiento y actividad de este tipo de dendrímeros en explantes *ex vivo* de tejido rectal, así como en modelos *in vivo*, con el fin de determinar si existe una potencial aplicabilidad de los mismos por vía rectal. Finalmente, y debido a la intención de aplicar estos compuestos como soluciones tópicas por vía vaginal, otro punto clave en el futuro desarrollo de estos agentes sería su formulación en forma de geles o cremas que permitiesen una cómoda y fácil posología. Para ello se plantean diversas estrategias como podría ser su disolución en geles de tipo HEC o carbopol o su liberación controlada a través de anillos vaginales. Esto se debe tener en cuenta como un paso previo antes de iniciar ensayos *in vivo*.

En resumen, todos los datos presentados nos muestran la relevancia de la nanotecnología en el campo de la Medicina y la Biología y apoyan el desarrollo de estrategias encaminadas a la utilización de diferentes familias de nanopartículas, como los dendrímeros, en la prevención y tratamiento de diferentes patologías y enfermedades infecciosas como el VIH.

CONCLUSIONES

6



CONCLUSIONS

- i). Maltose-decorated glycodendrimers and phosphorous dendrimers are able to increase the uptake of antigenic molecules into DC. However, both compounds modify the normal phenotype and functionality of DC. Only glycodendrimers have the ability to induce DC stimulation.
- ii). Complexes between glyco and phosphorous dendrimers with HIV derived peptides cannot stimulate T-cell proliferation in ex vivo autologous co-cultures.
- iii). Sulphated and naphthylsulfonated functionalized carbosilane dendrimers G3-S16 and G2-NF16 are showed as safety and effective compounds against HIV-1 and other sexually transmitted pathogens, such as HSV-2. No irritation, inflammation or vaginal lesions were detected in *in vivo* and *in vitro* models after dendrimers administration.
- iv). Combinations of anionic carbosilane dendrimers G3-S16 and G2-NF16 with different antiretrovirals, such as zidovudine, efavirenz, maraviroc and tenofovir, showed a synergistic or additive activity profile in the majority of combinations tested against X4 and R5 tropic HIV-1 in cell lines as well as in primary human cells.
- v). Carbosilane dendrimers' mode of action is a multifactorial process including several proteins from viral envelope as well as from host cell. They are able to inhibit viral infection at fusion step, blocking gp120/CD4 interaction. In addition, G3-S16 and G2-NF16 inhibit cell-to-cell HIV transmission and difficult infectious synapse formation.

CONCLUSIONES

- i). Los glicodendrimeros decorados con maltosa y los dendrimeros derivados del fósforo se pueden usar como agentes transportadores para la carga y liberación de moléculas antigénicas en CD. Sin embargo, ambos tipos de compuestos, así como sus complejos, modifican el fenotipo y funcionalidad de las CD. Sólo los glicodendrimeros inducen una inmunoestimulación de las CD.
- ii). Complejos de glico y fosfordendrimeros con péptidos derivados del VIH no estimularon la proliferación de células T en co-cultivos autólogos *ex vivo*.
- iii). Los dendrimeros polianiónicos carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 tienen una alta actividad antiviral *in vitro* frente a diferentes cepas y aislados primarios de VIH, así como frente a otros virus de transmisión sexual como el VHS-2. Además son altamente biocompatibles y seguros, no produciendo inflamación ni irritación en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- iv). La combinación de los dendrimeros carbosilanos aniónicos G3-S16 y G2-NF16 con otros agentes antirretrovirales como zidovudina, efavirenz, maraviroc y tenofovir mejora la eficacia antiviral de ambos frente al VIH-1, existiendo en la mayoría de las combinaciones ensayadas un efecto sinérgico o aditivo entre ellos, tanto en células primarias como en líneas celulares.
- v). Los dendrimeros carbosilanos G3-S16 y G2-NF16 presentan un mecanismo de acción multifactorial, debido a su unión a diversas proteínas tanto de la envuelta viral como de la membrana de la célula diana, inhibiendo la infección viral a nivel de la entrada mediante el bloqueo de la fusión de membranas. Además, estos compuestos inhiben la transmisión del VIH célula-célula y dificultan la formación de las sinapsis infecciosas.

BIBLIOGRAFÍA

1. (UNAIDS), J.U.N.P.o.H.A. 2012 UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic. (2012).
2. De Cock, K.M., Jaffe, H.W. & Curran, J.W. Reflections on 30 years of AIDS. *Emerg Infect Dis* **17**, 1044-1048 (2011).
3. Abdool Karim, S.S., Abdool Karim, Q., Gouws, E. & Baxter, C. Global epidemiology of HIV-AIDS. *Infect Dis Clin North Am* **21**, 1-17, vii (2007).
4. Gelderblom, H.R. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**, 617-637 (1991).
5. Zhao, G., et al. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature* **497**, 643-646 (2013).
6. Wilen, C.B., Tilton, J.C. & Doms, R.W. Molecular mechanisms of HIV entry. *Adv Exp Med Biol* **726**, 223-242 (2012).
7. Gilbert, P.B., et al. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* **22**, 573-593 (2003).
8. Levy, J.A. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* **7**, 1401-1410 (1993).
9. Taylor, B.S., Sobieszczyk, M.E., McCutchan, F.E. & Hammer, S.M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* **358**, 1590-1602 (2008).
10. Reeves, J.D. & Doms, R.W. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* **83**, 1253-1265 (2002).
11. Moss, J.A. HIV/AIDS Review. *Radiol Technol* **84**, 247-267; quiz p 268-270 (2013).
12. Chan, R. Biomedical strategies for human immunodeficiency virus (HIV) prevention? A new paradigm. *Ann Acad Med Singapore* **41**, 595-601 (2012).
13. Taha, T.E. Mother-to-child transmission of HIV-1 in sub-Saharan Africa: past, present and future challenges. *Life Sci* **88**, 917-921 (2011).
14. Siegfried, N., van der Merwe, L., Brocklehurst, P. & Sint, T.T. Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003510 (2011).
15. Wood, E., Milloy, M.J. & Montaner, J.S. HIV treatment as prevention among injection drug users. *Curr Opin HIV AIDS* **7**, 151-156 (2012).
16. Gant, L., Heath, K.M. & Ejikeme, G.G. Early motherhood, high mortality, and HIV/AIDS rates in Sub-Saharan Africa. *Soc Work Public Health* **24**, 39-46 (2009).
17. Perelson, A.S., et al. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**, 188-191 (1997).
18. Henrich, T.J., et al. Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis* **207**, 1694-1702 (2013).
19. Hutter, G., et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* **360**, 692-698 (2009).
20. Yukl, S.A., et al. Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog* **9**, e1003347 (2013).
21. Padian, N.S., et al. HIV prevention transformed: the new prevention research agenda. *Lancet* **378**, 269-278 (2011).
22. Padian, N.S., McCoy, S.I., Balkus, J.E. & Wasserheit, J.N. Weighing the gold in the gold standard: challenges in HIV prevention research. *AIDS* **24**, 621-635 (2010).
23. (UNAIDS), J.U.N.P.o.H.A. UNAIDS 2011–2015 STRATEGY: Getting to Zero. (2010).
24. Grant, R.M., et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N Engl J Med* **363**, 2587-2599 (2010).
25. Chirenje, Z.M., Marrazzo, J. & Parikh, U.M. Antiretroviral-based HIV prevention strategies for women. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**, 1177-1186 (2010).

26. Stephenson, J. Studies probe new anti-HIV strategy, long-term success of prevention methods. *JAMA* **305**, 1397-1399 (2011).
27. Cohen, M.S. & Baden, L.R. Preexposure prophylaxis for HIV--where do we go from here? *N Engl J Med* **367**, 459-461 (2012).
28. Kenyon, C. & Colebunders, R. Antiretroviral preexposure prophylaxis for HIV prevention. *N Engl J Med* **368**, 82 (2013).
29. Thigpen, M.C., *et al.* Antiretroviral preexposure prophylaxis for heterosexual HIV transmission in Botswana. *N Engl J Med* **367**, 423-434 (2012).
30. Celum, C. & Baeten, J.M. Tenofovir-based pre-exposure prophylaxis for HIV prevention: evolving evidence. *Curr Opin Infect Dis* **25**, 51-57 (2012).
31. Myers, G.M. & Mayer, K.H. Oral preexposure anti-HIV prophylaxis for high-risk U.S. populations: current considerations in light of new findings. *AIDS Patient Care STDS* **25**, 63-71 (2011).
32. Koff, W.C., *et al.* Accelerating next-generation vaccine development for global disease prevention. *Science* **340**, 1232910 (2013).
33. Esparza, J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine* (2013).
34. Abdool Karim, S.S. HIV vaccine and microbicide trials turn a corner. We still don't have an effective vaccine or microbicide for the clinic, but two major trials this year brought us closer than we've ever been. *J Watch AIDS Clin Care* **22**, 2 (2010).
35. Scherer, E., Douek, D. & McMichael, A. 25 years of HIV research on virology, virus restriction, immunopathogenesis, genes and vaccines. *Clin Exp Immunol* **154**, 6-14 (2008).
36. Sekaly, R.P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* **205**, 7-12 (2008).
37. Munier, C.M., Andersen, C.R. & Kelleher, A.D. HIV vaccines: progress to date. *Drugs* **71**, 387-414 (2011).
38. McElrath, M.J. & Haynes, B.F. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity* **33**, 542-554 (2010).
39. Vanham, G. & Van Gulck, E. Can immunotherapy be useful as a "functional cure" for infection with Human Immunodeficiency Virus-1? *Retrovirology* **9**, 72 (2012).
40. Rosati, M., *et al.* DNA vaccines expressing different forms of simian immunodeficiency virus antigens decrease viremia upon SIVmac251 challenge. *J Virol* **79**, 8480-8492 (2005).
41. Wilson, C.C., *et al.* Clinical phase 1 testing of the safety and immunogenicity of an epitope-based DNA vaccine in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 986-994 (2008).
42. Angel, J.B., *et al.* A randomized controlled trial of HIV therapeutic vaccination using ALVAC with or without Remune. *AIDS* **25**, 731-739 (2011).
43. Uberla, K., *et al.* Therapeutic immunization with Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) vaccines in SIV-infected rhesus monkeys undergoing antiretroviral therapy. *J Med Primatol* **36**, 2-9 (2007).
44. Shimada, M., *et al.* Effect of therapeutic immunization using Ad5/35 and MVA vectors on SIV infection of rhesus monkeys undergoing antiretroviral therapy. *Gene Ther* **16**, 218-228 (2009).
45. Rerks-Ngarm, S., *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* **361**, 2209-2220 (2009).
46. Pitisuttithum, P., *et al.* Safety and reactogenicity of canarypox ALVAC-HIV (vCP1521) and HIV-1 gp120 AIDSVAX B/E vaccination in an efficacy trial in Thailand. *PLoS One* **6**, e27837 (2011).
47. Network, H.V.T. Safety and Effectiveness of HIV-1 DNA Plasmid Vaccine and HIV-1 Recombinant Adenoviral Vector Vaccine in HIV-Uninfected, Circumcised Men and Male-to-Female (MTF) Transgender Persons Who Have Sex With Men. (niaid.nih.gov, 2013).

48. McEnery, R. HVTN 505 trial expanded to see if vaccine candidates can block HIV acquisition. *IAVI Rep* **15**, 17 (2011).
49. AVAC. AVAC Report 2012. (2012).
50. van Gils, M.J. & Sanders, R.W. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: templates for a vaccine. *Virology* **435**, 46-56 (2013).
51. Wu, X., *et al.* Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* **333**, 1593-1602 (2011).
52. Walker, L.M., *et al.* Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* **477**, 466-470 (2011).
53. Balazs, A.B., *et al.* Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature* **481**, 81-84 (2012).
54. Berkhout, B. & Sanders, R.W. Gene therapy as a vaccine for HIV-1. *Expert Opin Biol Ther* **12**, 1315-1321 (2012).
55. Girard, M.P., Osmanov, S., Assossou, O.M. & Kieny, M.P. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. *Vaccine* **29**, 6191-6218 (2011).
56. Garcia, F. & Routy, J.P. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1. *Vaccine* **29**, 6454-6463 (2011).
57. Connolly, N.C., Colleton, B.A. & Rinaldo, C.R. Treating HIV-1 infection with dendritic cells. *Curr Opin Mol Ther* **9**, 353-363 (2007).
58. Palucka, K., Banchereau, J. & Mellman, I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* **33**, 464-478 (2010).
59. Zhang, H., *et al.* Comparing pooled peptides with intact protein for accessing cross-presentation pathways for protective CD8⁺ and CD4⁺ T cells. *J Biol Chem* **284**, 9184-9191 (2009).
60. Steinman, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* **30**, 1-22 (2012).
61. Connolly, N.C., *et al.* Therapeutic immunization with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) peptide-loaded dendritic cells is safe and induces immunogenicity in HIV-1-infected individuals. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 284-292 (2008).
62. Trepikak, R., *et al.* Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: results from a phase I/II trial. *Cytotherapy* **12**, 721-734 (2010).
63. Thara, E., Dorff, T.B., Pinski, J.K. & Quinn, D.I. Vaccine therapy with sipuleucel-T (Provenge) for prostate cancer. *Maturitas* **69**, 296-303 (2011).
64. Hsu, F.J., *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **2**, 52-58 (1996).
65. Jefford, M., Maraskovsky, E., Cebon, J. & Davis, I.D. The use of dendritic cells in cancer therapy. *Lancet Oncol* **2**, 343-353 (2001).
66. Rinaldo, C.R. Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine. *J Intern Med* **265**, 138-158 (2009).
67. Gandhi, R.T., *et al.* A randomized therapeutic vaccine trial of canarypox-HIV-pulsed dendritic cells vs. canarypox-HIV alone in HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. *Vaccine* **27**, 6088-6094 (2009).
68. Yoshida, A., *et al.* Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin. *J Virol* **77**, 8719-8728 (2003).

69. Jonuleit, H., *et al.* Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J Immunol* **158**, 2610-2615 (1997).
70. Van Tendeloo, V.F., *et al.* Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* **98**, 49-56 (2001).
71. Garcia, F. 'Functional cure' of HIV infection: the role of immunotherapy. *Immunotherapy* **4**, 245-248 (2012).
72. Ahlers, J.D. & Belyakov, I.M. Strategies for recruiting and targeting dendritic cells for optimizing HIV vaccines. *Trends Mol Med* **15**, 263-274 (2009).
73. Trumpfheller, C., *et al.* Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J Intern Med* **271**, 183-192 (2012).
74. Lu, W., Arraes, L.C., Ferreira, W.T. & Andrieu, J.M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**, 1359-1365 (2004).
75. Garcia, F., Ruiz, L., Lopez-Bernaldo de Quiros, J.C., Moreno, S. & Domingo, P. Immunotherapy and therapeutic vaccines in HIV infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23 Suppl 2**, 84-104 (2005).
76. Garcia, F., *et al.* A therapeutic dendritic cell-based vaccine for HIV-1 infection. *J Infect Dis* **203**, 473-478 (2011).
77. Garcia, F., *et al.* A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication. *Sci Transl Med* **5**, 166ra162 (2013).
78. Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 351-358 (2002).
79. Gamble, L.J. & Matthews, Q.L. Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. *Drug Des Devel Ther* **5**, 9-26 (2010).
80. Kiepiela, P., *et al.* CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* **13**, 46-53 (2007).
81. Rolland, M., *et al.* Broad and Gag-biased HIV-1 epitope repertoires are associated with lower viral loads. *PLoS One* **3**, e1424 (2008).
82. Smed-Sorensen, A. & Lore, K. Targeting dendritic cells for improved HIV-1 vaccines. *Adv Exp Med Biol* **762**, 263-288 (2013).
83. Richman, D.D., *et al.* The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* **323**, 1304-1307 (2009).
84. Abdool Karim, S.S. & Baxter, C. Microbicides & their implications in HIV prevention. *Indian J Med Res* **132**, 656-659 (2010).
85. Anton, P.A. Future prospects and perspectives on microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 113-115 (2012).
86. Buckheit, R.W., Jr., Watson, K.M., Morrow, K.M. & Ham, A.S. Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV. *Antiviral Res* **85**, 142-158 (2010).
87. Quinones-Mateu, M.E. & Vanham, G. HIV microbicides: where are we now? *Curr HIV Res* **10**, 1-2 (2012).
88. Grant, R.M., *et al.* Whither or wither microbicides? *Science* **321**, 532-534 (2008).
89. Mertenskoetter, T. & Kaptur, P.E. Update on microbicide research and development - seeking new HIV prevention tools for women. *Eur J Med Res* **16**, 1-6 (2011).
90. Vanpouille, C., Arakelyan, A. & Margolis, L. Microbicides: still a long road to success. *Trends Microbiol* (2012).
91. Obiero, J., Mwethera, P.G. & Wiysonge, C.S. Topical microbicides for prevention of sexually transmitted infections. *Cochrane Database Syst Rev* **6**, CD007961 (2012).
92. Cutler, B. & Justman, J. Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. *Lancet Infect Dis* **8**, 685-697 (2008).
93. Buckheit, R.W., Jr. & Buckheit, K.W. An algorithm for the preclinical development of anti-HIV topical microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 97-104 (2012).

94. Gibson, R.M. & Arts, E.J. Past, present, and future of entry inhibitors as HIV microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 19-26 (2012).
95. Herrera, C. & Shattock, R.J. Potential use of protease inhibitors as vaginal and colorectal microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 42-52 (2012).
96. Kelly, C.G. & Shattock, R.J. Specific microbicides in the prevention of HIV infection. *J Intern Med* **270**, 509-519 (2011).
97. Romano, J.W., Robbiani, M., Doncel, G.F. & Moench, T. Non-specific microbicide product development: then and now. *Curr HIV Res* **10**, 9-18 (2012).
98. Lewi, P., *et al.* Reverse transcriptase inhibitors as microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 27-35 (2012).
99. Crucitti, G.C., Botta, M. & Di Santo, R. Will integrase inhibitors be used as microbicides? *Curr HIV Res* **10**, 36-41 (2012).
100. Baba, M., *et al.* Novel sulfated polymers as highly potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication and giant cell formation. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 134-138 (1990).
101. Pearce-Pratt, R. & Phillips, D.M. Sulfated polysaccharides inhibit lymphocyte-to-epithelial transmission of human immunodeficiency virus-1. *Biol Reprod* **54**, 173-182 (1996).
102. Scordi-Bello, I.A., *et al.* Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3607-3615 (2005).
103. Huskens, D., Vermeire, K., Profy, A.T. & Schols, D. The candidate sulfonated microbicide, PRO 2000, has potential multiple mechanisms of action against HIV-1. *Antiviral Res* **84**, 38-47 (2009).
104. Pirrone, V., Wigdahl, B. & Krebs, F.C. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res* **90**, 168-182 (2011).
105. Reina, J.J., Bernardi, A., Clerici, M. & Rojo, J. HIV microbicides: state-of-the-art and new perspectives on the development of entry inhibitors. *Future Med Chem* **2**, 1141-1159 (2010).
106. Hicks, D.R., *et al.* Inactivation of HTLV-III/LAV-infected cultures of normal human lymphocytes by nonoxynol-9 in vitro. *Lancet* **2**, 1422-1423 (1985).
107. Stafford, M.K., *et al.* Safety study of nonoxynol-9 as a vaginal microbicide: evidence of adverse effects. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**, 327-331 (1998).
108. Fichorova, R.N., Tucker, L.D. & Anderson, D.J. The molecular basis of nonoxynol-9-induced vaginal inflammation and its possible relevance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* **184**, 418-428 (2001).
109. Baranova, E.O., Shastina, N.S. & Shvets, V.I. [Polyanionic inhibitors of HIV adsorption]. *Bioorg Khim* **37**, 592-608 (2011).
110. Witvrouw, M., *et al.* Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol Pharmacol* **58**, 1100-1108 (2000).
111. Keller, M.J., *et al.* Postcoital bioavailability and antiviral activity of 0.5% PRO 2000 gel: implications for future microbicide clinical trials. *PLoS One* **5**, e8781 (2010).
112. Tao, W., Richards, C. & Hamer, D. Enhancement of HIV infection by cellulose sulfate. *AIDS Res Hum Retroviruses* **24**, 925-929 (2008).
113. Granich, R., *et al.* Highly active antiretroviral treatment as prevention of HIV transmission: review of scientific evidence and update. *Curr Opin HIV AIDS* **5**, 298-304 (2010).
114. Klasse, P.J., Shattock, R. & Moore, J.P. Antiretroviral drug-based microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *Annu Rev Med* **59**, 455-471 (2008).
115. Omar, R.F. & Bergeron, M.G. The future of microbicides. *Int J Infect Dis* **15**, e656-660 (2011).

116. Shattock, R.J. & Rosenberg, Z. Microbicides: Topical Prevention against HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a007385 (2012).
117. Abdool Karim, Q., et al. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* **329**, 1168-1174 (2010).
118. Gengiah, T.N., Baxter, C., Mansoor, L.E., Kharsany, A.B. & Abdool Karim, S.S. A drug evaluation of 1% tenofovir gel and tenofovir disoproxil fumarate tablets for the prevention of HIV infection. *Expert Opin Investig Drugs* **21**, 695-715 (2012).
119. MNT-Statement. MTN Statement on Decision to Discontinue Use of Tenofovir Gel in VOICE, a Major HIV Prevention Study in Women. (2011).
120. AVAC. Ongoing and Planned Clinical Trials of Microbicide Candidates. (2012).
121. McGowan, I. & Dezzutti, C. Rectal Microbicide Development. *Curr Top Microbiol Immunol* (2013).
122. Patton, D.L., et al. Preclinical safety assessments of UC781 anti-human immunodeficiency virus topical microbicide formulations. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1608-1615 (2007).
123. Nel, A.M., Smythe, S.C., Habibi, S., Kaptur, P.E. & Romano, J.W. Pharmacokinetics of 2 dapivirine vaginal microbicide gels and their safety vs. Hydroxyethyl cellulose-based universal placebo gel. *J Acquir Immune Defic Syndr* **55**, 161-169 (2010).
124. Stefanidou, M., Herrera, C., Armanasco, N. & Shattock, R.J. Saquinavir Inhibits Early Events Associated with Establishment of HIV-1 Infection: Potential Role for Protease Inhibitors in Prevention. *Antimicrob Agents Chemother* (2012).
125. De Clercq, E. Where rilpivirine meets with tenofovir, the start of a new anti-HIV drug combination era. *Biochem Pharmacol* **84**, 241-248 (2012).
126. Emau, P., et al. Griffithsin, a potent HIV entry inhibitor, is an excellent candidate for anti-HIV microbicide. *J Med Primatol* **36**, 244-253 (2007).
127. Li, L., et al. Efficacy, Stability, and Biosafety of Sifuvirtide Gel as a Microbicide Candidate against HIV-1. *PLoS One* **7**, e37381 (2012).
128. Tsai, C.C., et al. Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 535-541 (2003).
129. Veazey, R.S., et al. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120. *Nat Med* **9**, 343-346 (2003).
130. Veazey, R.S., et al. Protection of rhesus macaques from vaginal infection by vaginally delivered maraviroc, an inhibitor of HIV-1 entry via the CCR5 co-receptor. *J Infect Dis* **202**, 739-744 (2010).
131. Lederman, M.M., et al. Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science* **306**, 485-487 (2004).
132. Neff, C.P., Kurisu, T., Ndolo, T., Fox, K. & Akkina, R. A topical microbicide gel formulation of CCR5 antagonist maraviroc prevents HIV-1 vaginal transmission in humanized RAG-hu mice. *PLoS One* **6**, e20209 (2011).
133. Barouch, D.H., Klasse, P.J., Dufour, J., Veazey, R.S. & Moore, J.P. Macaque studies of vaccine and microbicide combinations for preventing HIV-1 sexual transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 8694-8698 (2012).
134. Abdool Karim, S.S. & Baxter, C. Microbicides for Prevention of HIV Infection: Clinical Efficacy Trials. *Curr Top Microbiol Immunol* (2013).
135. Malcolm, R.K., Fetherston, S.M., McCoy, C.F., Boyd, P. & Major, I. Vaginal rings for delivery of HIV microbicides. *Int J Womens Health* **4**, 595-605 (2012).
136. Fetherston, S.M., et al. A silicone elastomer vaginal ring for HIV prevention containing two microbicides with different mechanisms of action. *Eur J Pharm Sci* **48**, 406-415 (2012).

137. Cohen, C.R., *et al.* A phase I randomized placebo controlled trial of the safety of 3% SPL7013 Gel (VivaGel(R)) in healthy young women administered twice daily for 14 days. *PLoS One* **6**, e16258 (2011).
138. Price, C.F., *et al.* SPL7013 Gel (VivaGel(R)) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans. *PLoS One* **6**, e24095 (2011).
139. Lozano, V., *et al.* Targeting HIV entry through interaction with envelope glycoprotein 120 (gp120): synthesis and antiviral evaluation of 1,3,5-triazines with aromatic amino acids. *J Med Chem* **54**, 5335-5348 (2011).
140. Qiu, M., *et al.* Lignosulfonic acid exhibits broadly anti-HIV-1 activity--potential as a microbicide candidate for the prevention of HIV-1 sexual transmission. *PLoS One* **7**, e35906 (2012).
141. Vercruysse, T., *et al.* A phenyl-thiadiazolylidene-amine derivative ejects zinc from retroviral nucleocapsid zinc fingers and inactivates HIV virions. *Retrovirology* **9**, 95 (2012).
142. Forthal, D.N., *et al.* In vitro anti-HIV-1 activity of salicylidene acylhydrazide compounds. *Int J Antimicrob Agents* **40**, 354-360 (2012).
143. Watson Buckheit, K., Yang, L. & Buckheit, R.W., Jr. Development of dual-acting pyrimidinediones as novel and highly potent topical anti-HIV microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5243-5254 (2011).
144. Belec, L., Jenabian, M.A., Charpentier, C. & Saidi, H. Combinatorial prevention of HIV transmission in women: the case for a vaginal microbicide. *Future Microbiol* **6**, 731-737 (2011).
145. Pirrone, V., Thakkar, N., Jacobson, J.M., Wigdahl, B. & Krebs, F.C. Combinatorial approaches to the prevention and treatment of HIV-1 infection. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1831-1842 (2011).
146. Ferir, G., *et al.* Synergistic in vitro anti-HIV type 1 activity of tenofovir with carbohydrate-binding agents (CBAs). *Antiviral Res* **90**, 200-204 (2011).
147. Ham, A.S., *et al.* Development of a combination microbicide gel formulation containing IQP-0528 and tenofovir for the prevention of HIV infection. *J Pharm Sci* **101**, 1423-1435 (2012).
148. Mulato, A.S. & Cherrington, J.M. Anti-HIV activity of adefovir (PMEA) and PMPA in combination with antiretroviral compounds: in vitro analyses. *Antiviral Res* **36**, 91-97 (1997).
149. Vermeire, K., *et al.* CADA, a potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor. *Curr HIV Res* **6**, 246-256 (2008).
150. Vermeire, K., *et al.* CADA, a novel CD4-targeted HIV inhibitor, is synergistic with various anti-HIV drugs in vitro. *AIDS* **18**, 2115-2125 (2004).
151. Ferir, G., *et al.* Combinations of Griffithsin with Other Carbohydrate-Binding Agents Demonstrate Superior Activity Against HIV Type 1, HIV Type 2, and Selected Carbohydrate-Binding Agent-Resistant HIV Type 1 Strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2012).
152. Ferir, G., Palmer, K.E. & Schols, D. Synergistic activity profile of griffithsin in combination with tenofovir, maraviroc and enfuvirtide against HIV-1 clade C. *Virology* **417**, 253-258 (2011).
153. Moss, J.A., *et al.* Simultaneous delivery of tenofovir and acyclovir via an intravaginal ring. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 875-882 (2012).
154. Kim, B.Y., Rutka, J.T. & Chan, W.C. Nanomedicine. *N Engl J Med* **363**, 2434-2443 (2010).
155. Mallipeddi, R. & Rohan, L.C. Progress in antiretroviral drug delivery using nanotechnology. *Int J Nanomedicine* **5**, 533-547 (2010).
156. Mahajan, S.D., *et al.* Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future. *Int J Nanomedicine* **7**, 5301-5314 (2012).
157. Siccardi, M., *et al.* Nanomedicines for HIV therapy. *Ther Deliv* **4**, 153-156 (2013).
158. Zhang, J., *et al.* Antiviral peptide nanocomplexes as a potential therapeutic modality for HIV/HCV co-infection. *Biomaterials* **34**, 3846-3857 (2013).

159. Date, A.A. & Destache, C.J. A review of nanotechnological approaches for the prophylaxis of HIV/AIDS. *Biomaterials* **34**, 6202-6228 (2013).
160. Kinman, L., et al. Lipid-drug association enhanced HIV-1 protease inhibitor indinavir localization in lymphoid tissues and viral load reduction: a proof of concept study in HIV-2287-infected macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**, 387-397 (2003).
161. Kinman, L., et al. Optimization of lipid-indinavir complexes for localization in lymphoid tissues of HIV-infected macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* **42**, 155-161 (2006).
162. Sharma, P. & Garg, S. Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 491-502 (2010).
163. Rabinow, B.E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 785-796 (2004).
164. Hillaireau, H., Le Doan, T., Appel, M. & Couvreur, P. Hybrid polymer nanocapsules enhance in vitro delivery of azidothymidine-triphosphate to macrophages. *J Control Release* **116**, 346-352 (2006).
165. Hillaireau, H., et al. Encapsulation of antiviral nucleotide analogues azidothymidine-triphosphate and cidofovir in poly(iso-butylcyanoacrylate) nanocapsules. *Int J Pharm* **324**, 37-42 (2006).
166. Kovochich, M., Marsden, M.D. & Zack, J.A. Activation of latent HIV using drug-loaded nanoparticles. *PLoS One* **6**, e18270 (2011).
167. Lori, F. DermaVir: a plasmid DNA-based nanomedicine therapeutic vaccine for the treatment of HIV/AIDS. *Expert Rev Vaccines* **10**, 1371-1384 (2011).
168. Lisiewicz, J., et al. Single DermaVir immunization: dose-dependent expansion of precursor/memory T cells against all HIV antigens in HIV-1 infected individuals. *PLoS One* **7**, e35416 (2012).
169. Li, M., Jiang, Y., Xu, C., Zhang, Z. & Sun, X. Enhanced immune response against HIV-1 induced by a heterologous DNA prime-adenovirus boost vaccination using mannosylated polyethyleneimine as DNA vaccine adjuvant. *Int J Nanomedicine* **8**, 1843-1854 (2013).
170. Klajnert, B. & Bryszewska, M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochim Pol* **48**, 199-208 (2001).
171. Parboosing, R., Maguire, G.E., Govender, P. & Kruger, H.G. Nanotechnology and the treatment of HIV infection. *Viruses* **4**, 488-520 (2012).
172. Svenson, S. & Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2106-2129 (2005).
173. Lazniewska, J., Milowska, K. & Gabryelak, T. Dendrimers--revolutionary drugs for infectious diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **4**, 469-491 (2012).
174. Ortega, P., et al. Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies. *Org Biomol Chem* **6**, 3264-3269 (2008).
175. Ciepluch, K., et al. Biological properties of new viologen-phosphorus dendrimers. *Mol Pharm* **9**, 448-457 (2012).
176. Jiang, Y.H., et al. SPL7013 gel as a topical microbicide for prevention of vaginal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 207-213 (2005).
177. Tyssen, D., et al. Structure activity relationship of dendrimer microbicides with dual action antiviral activity. *PLoS One* **5**, e12309 (2010).
178. Telwatte, S., et al. Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1. *Antiviral Res* **90**, 195-199 (2011).
179. Rupp, R., Rosenthal, S.L. & Stanberry, L.R. VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int J Nanomedicine* **2**, 561-566 (2007).
180. McGowan, I., et al. Phase 1 randomized trial of the vaginal safety and acceptability of SPL7013 gel (VivaGel) in sexually active young women (MTN-004). *AIDS* **25**, 1057-1064 (2011).
181. Jensen, L.B., et al. Elucidating the molecular mechanism of PAMAM-siRNA dendriplex self-assembly: effect of dendrimer charge density. *Int J Pharm* **416**, 410-418 (2011).

182. Chonco, L., *et al.* Carbosilane dendrimer nanotechnology outlines of the broad HIV blocker profile. *J Control Release* **161**, 949-958 (2012).
183. Garcia-Gallego, S., *et al.* Polyanionic N-donor ligands as chelating agents in transition metal complexes: synthesis, structural characterization and antiviral properties against HIV. *Dalton Trans* **41**, 6488-6499 (2012).
184. Asaftei, S., Huskens, D. & Schols, D. HIV-1 X4 Activities of Polycationic "Viologen" Based Dendrimers by Interaction with the Chemokine Receptor CXCR4: Study of Structure-Activity Relationship. *J Med Chem* **55**, 10405-10413 (2012).
185. Rosa Borges, A., *et al.* Multivalent dendrimeric compounds containing carbohydrates expressed on immune cells inhibit infection by primary isolates of HIV-1. *Virology* **408**, 80-88 (2010).
186. Garcia-Vallejo, J.J., *et al.* Glycodendrimers prevent HIV transmission via DC-SIGN on dendritic cells. *Int Immunol* **25**, 221-233 (2013).
187. Bermejo, J.F., *et al.* Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry* **13**, 483-495 (2007).
188. Briz, V., *et al.* Validation of a generation 4 phosphorus-containing polycationic dendrimer for gene delivery against HIV-1. *Curr Med Chem* **19**, 5044-5051 (2012).
189. Fischer, W., Claderon, M., Ofek, P., Satchi-Fainaro, R. & Haag, R. siRNA transfection by dendritic core-shell nanocarriers. *J Control Release* **148**, e89 (2010).
190. Janaszewska, A.Z., B; Ciepluch, K., Appelhans, D.; Voit, B.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. The biodistribution of maltotriose modified poly(propylene imine) (PPI) dendrimers conjugated with fluorescein—proofs of crossing blood–brain–barrier. *New Journal of Chemistry* **35**(2012).
191. Tian, W.D. & Ma, Y.Q. Theoretical and computational studies of dendrimers as delivery vectors. *Chem Soc Rev* **42**, 705-727 (2013).
192. Dutta, T., *et al.* Poly (propyleneimine) dendrimer based nanocontainers for targeting of efavirenz to human monocytes/macrophages in vitro. *J Drug Target* **15**, 89-98 (2007).
193. Dutta, T. & Jain, N.K. Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannosylated poly (propyleneimine) dendrimer. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 681-686 (2007).
194. Gajbhiye, V., Ganesh, N., Barve, J. & Jain, N.K. Synthesis, characterization and targeting potential of zidovudine loaded sialic acid conjugated-mannosylated poly(propyleneimine) dendrimers. *Eur J Pharm Sci* **48**, 668-679 (2013).
195. Szewczyk, M., *et al.* Stability of dendriplexes formed by anti-HIV genetic material and poly(propylene imine) dendrimers in the presence of glucosaminoglycans. *J Phys Chem B* **116**, 14525-14532 (2012).
196. Pedziwiatr-Werbicka, E., *et al.* Novel 'SiC' carbosilane dendrimers as carriers for anti-HIV nucleic acids: Studies on complexation and interaction with blood cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* **109**, 183-189 (2013).
197. Cordoba, E.V., *et al.* Glycodendrimers as new tools in the search for effective anti-HIV DC-based immunotherapies. *Nanomedicine* (2013).
198. Klajnert, B., *et al.* The influence of densely organized maltose shells on the biological properties of poly(propylene imine) dendrimers: new effects dependent on hydrogen bonding. *Chemistry* **14**, 7030-7041 (2008).
199. Klementieva, O., *et al.* Dense shell glycodendrimers as potential nontoxic anti-amyloidogenic agents in Alzheimer's disease. Amyloid--dendrimer aggregates morphology and cell toxicity. *Biomacromolecules* **12**, 3903-3909 (2011).
200. Caminade, A.M., Turrin, C.O. & Majoral, J.P. Biological properties of phosphorus dendrimers *New Journal of Chemistry* **34**, 1512-1524 (2010).
201. Caminade, A.M., Laurent, R., Zablocka, M. & Majoral, J.P. Organophosphorus chemistry for the synthesis of dendrimers. *Molecules* **17**, 13605-13621 (2012).

202. Caminade, A.M. & Majoral, J.P. Water-soluble phosphorus-containing dendrimers. *Progress in Polymer Science* **30**, 491-505 (2005).
203. Loup, C., Zanta, M.A., Caminade, A.M., Majoral, J.P. & Meunier, B. Preparation of Water-Soluble Cationic Phosphorus-Containing Dendrimers as DNA Transfecting Agents. *Chemistry a European Journal* **5**, 36644-33650 (1999).
204. Maksimenko, A.V., et al. Optimisation of dendrimer-mediated gene transfer by anionic oligomers. *J Gene Med* **5**, 61-71 (2003).
205. Solassol, J., et al. Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie. *J Gen Virol* **85**, 1791-1799 (2004).
206. Hayder, M., et al. A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci Transl Med* **3**, 81ra35 (2011).
207. Fruchon, S., et al. An Azabisphosphonate-Capped Poly(phosphorhydrazone) Dendrimer for the Treatment of Endotoxin-Induced Uveitis. *Molecules* **18**, 9305-9316 (2013).
208. Ionov, M., et al. Complexation of HIV derived peptides with carbosilane dendrimers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **101**, 236-242 (2013).
209. Jimenez, J.L., et al. Carbosilane dendrimers to transfect human astrocytes with small interfering RNA targeting human immunodeficiency virus. *BioDrugs* **24**, 331-343 (2010).
210. Pedziwiatr, E., et al. Binding properties of water-soluble carbosilane dendrimers. *J Fluoresc* **19**, 267-275 (2009).
211. Pion, M., et al. Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer. *Biomaterials* **31**, 8749-8758 (2010).
212. Rasines B, et al. Anionic Carbosilane Dendrimers: Synthesis, Structure, Molecular Modeling and Antiviral Activity- Submitted manuscript.
213. Rasines, B., et al. Water-stable ammonium-terminated carbosilane dendrimers as efficient antibacterial agents. *Dalton Trans*, 8704-8713 (2009).
214. Weber, N., et al. Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release* **132**, 55-64 (2008).
215. Cordoba, E.V., et al. Development of sulphated and naphthylsulfonated carbosilane dendrimers as topical microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *AIDS* (2013).
216. Galan, M., et al. Antiviral properties against HIV of water soluble copper carbosilane dendrimers and their EPR characterization. *Curr Med Chem* (2012).
217. Appelhans, D., et al. Hyperbranched PEI with various oligosaccharide architectures: synthesis, characterization, ATP complexation, and cellular uptake properties. *Biomacromolecules* **10**, 1114-1124 (2009).
218. Garcia-Merino, I., et al. The Spanish HIV BioBank: a model of cooperative HIV research. *Retrovirology* **6**, 27 (2009).
219. Bjorndal, A., et al. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* **71**, 7478-7487 (1997).
220. Chou, T.C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**, 27-55 (1984).
221. Ciolkowski, M., et al. The influence of maltose modified poly(propylene imine) dendrimers on hen egg white lysozyme structure and thermal stability. *Colloids Surf B Biointerfaces* **95**, 103-108 (2012).
222. Kameyama, S., et al. Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. *Biopolymers* **88**, 98-107 (2007).
223. Yahi, N., et al. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. *J Biol Chem* **269**, 24349-24353 (1994).

224. Nazli, A., *et al.* Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog* **6**, e1000852 (2010).
225. Fischetti, L., *et al.* Molecular epidemiology of HIV in Ghana: dominance of CRF02_AG. *J Med Virol* **73**, 158-166 (2004).
226. Eckstein, P., Jackson, M.C., Millman, N. & Sobrero, A.J. Comparison of vaginal tolerance tests of spermicidal preparations in rabbits and monkeys. *J Reprod Fertil* **20**, 85-93 (1969).
227. Kish-Catalone, T.M., Lu, W., Gallo, R.C. & DeVico, A.L. Preclinical evaluation of synthetic -2 RANTES as a candidate vaginal microbicide to target CCR5. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1497-1509 (2006).
228. Qiu, S., *et al.* The binding mode of fusion inhibitor T20 onto HIV-1 gp41 and relevant T20-resistant mechanisms explored by computational study. *Curr HIV Res* **10**, 182-194 (2012).
229. Garcia, E., *et al.* HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6**, 488-501 (2005).
230. Yu, H.J., Reuter, M.A. & McDonald, D. HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells. *PLoS Pathog* **4**, e1000134 (2008).
231. Carrillo-Conde, B., *et al.* Mannose-functionalized "pathogen-like" polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells. *Mol Pharm* **8**, 1877-1886 (2011).
232. Cho, H.J., *et al.* Maltosylated polyethylenimine-based triple nanocomplexes of human papillomavirus 16L1 protein and DNA as a vaccine co-delivery system. *Biomaterials* **32**, 4621-4629 (2011).
233. Irache, J.M., Salman, H.H., Gamazo, C. & Espuelas, S. Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* **5**, 703-724 (2008).
234. Park, I.Y., *et al.* Mannosylated polyethylenimine coupled mesoporous silica nanoparticles for receptor-mediated gene delivery. *Int J Pharm* **359**, 280-287 (2008).
235. Song, C.K., *et al.* Disaccharide-modified liposomes and their in vitro intracellular uptake. *Int J Pharm* **380**, 161-169 (2009).
236. De Vries, I.J., *et al.* Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* **63**, 12-17 (2003).
237. Zhu, A., Romero, R., Huang, J.B., Clark, A. & Petty, H.R. Maltooligosaccharides from JEG-3 trophoblast-like cells exhibit immunoregulatory properties. *Am J Reprod Immunol* **65**, 54-64 (2011).
238. Hobel, S., *et al.* Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. *J Control Release* **149**, 146-158 (2011).
239. Ziembra, B., *et al.* In vivo toxicity of poly(propyleneimine) dendrimers. *J Biomed Mater Res A* **99**, 261-268 (2011).
240. Torres, M.P., *et al.* Polyanhydride microparticles enhance dendritic cell antigen presentation and activation. *Acta Biomater* **7**, 2857-2864 (2011).
241. Stenger, E.O., Turnquist, H.R., Mapara, M.Y. & Thomson, A.W. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood* **119**, 5088-5103 (2012).
242. Lewis, K.L. & Reizis, B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a007401 (2012).
243. Giannoukakis, N., Phillips, B., Finegold, D., Harnaha, J. & Trucco, M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* **34**, 2026-2032 (2011).
244. Giannoukakis, N. & Trucco, M. A role for tolerogenic dendritic cell-induced B-regulatory cells in type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **19**, 279-287 (2012).
245. Goldmann, K., Ensminger, S.M. & Spriewald, B.M. Oral Gene Application Using Chitosan-DNA Nanoparticles Induces Transferable Tolerance. *Clin Vaccine Immunol* **19**, 1758-1764 (2012).

246. Iltisregui, J.M., et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* **10**, 981-991 (2009).
247. Morelli, A.E. & Thomson, A.W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* **7**, 610-621 (2007).
248. Qian, C., et al. Fas signal promotes the immunosuppressive function of regulatory dendritic cells via ERK/beta-catenin pathway. *J Biol Chem* (2013).
249. Ribeiro-Viana, R., et al. Virus-like glycodendrinanoparticles displaying quasi-equivalent nested polyvalency upon glycoprotein platforms potentially block viral infection. *Nat Commun* **3**, 1303 (2012).
250. Shattock, R.J. & Moore, J.P. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* **1**, 25-34 (2003).
251. Jimenez, J., et al. Dendrimers as topical microbicides with activity against HIV. *New J. Chem* **36**, 299-309 (2012).
252. Saba, E., et al. HIV-1 sexual transmission: early events of HIV-1 infection of human cervico-vaginal tissue in an optimized ex vivo model. *Mucosal Immunol* **3**, 280-290 (2010).
253. Grivel, J.C., Shattock, R.J. & Margolis, L.B. Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper? *J Transl Med* **9 Suppl 1**, S6 (2011).
254. Coleman, C.M., Gelais, C.S. & Wu, L. Cellular and viral mechanisms of HIV-1 transmission mediated by dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* **762**, 109-130 (2013).
255. Izquierdo-Useros, N., et al. Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol* **10**, e1001448 (2012).
256. Rodriguez-Plata, M.T., et al. The infectious synapse formed between mature dendritic cells and CD4+ T cells is independent of the presence of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Retrovirology* **10**, 42 (2013).
257. Geijtenbeek, T.B., et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-597 (2000).
258. Geijtenbeek, T.B., et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575-585 (2000).
259. Geijtenbeek, T.B. & van Kooyk, Y. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol* **276**, 31-54 (2003).
260. Paz-Bailey, G., Ramaswamy, M., Hawkes, S.J. & Geretti, A.M. Herpes simplex virus type 2: epidemiology and management options in developing countries. *Sex Transm Infect* **83**, 16-22 (2007).
261. Balzarini, J. & Schols, D. Combination of antiretroviral drugs as microbicides. *Curr HIV Res* **10**, 53-60 (2012).
262. Huang, T.T., et al. Toca 511 gene transfer and 5-fluorocytosine in combination with temozolomide demonstrates synergistic therapeutic efficacy in a temozolomide-sensitive glioblastoma model. *Cancer Gene Ther* (2013).
263. Porcu, G., et al. Combined p21-activated kinase and farnesyltransferase inhibitor treatment exhibits enhanced anti-proliferative activity on melanoma, colon and lung cancer cell lines. *Mol Cancer* **12**, 88 (2013).
264. Van Damme, L., et al. Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med* **359**, 463-472 (2008).

PÁGINAS WEB DE INTERÉS

- ✓ AVERT: <http://www.avert.org>
- ✓ Campaña Global para los Microbicidas: <http://www.global-campaign.org/>
- ✓ Centro de Programas de Investigación del SIDA de Sudáfrica (CAPRISA):
<http://www.caprisa.org/SitePages/Home.aspx>
- ✓ Grupo Global de Apoyo para la Prevención del VIH (AVAC): <http://www.avac.org/>
- ✓ Grupo de Trabajo para el Seguimiento de Recursos sobre Vacunas y Microbicidas frente al VIH: <http://hivresourcetracking.org/>
- ✓ ONUSIDA: <http://www.unaids.org/es/>
- ✓ Organización Mundial de la Salud (OMS): <http://www.who.int/hiv/en/>
- ✓ Partenariado Internacional para los Microbicidas (IPM): <http://www.ipmglobal.org/>
- ✓ Programa de Investigación sobre VIH del Ejército de EE.UU. (MHRP):
<http://www.hivresearch.org/home.php>
- ✓ Programa de SIDA del Dpto. de Salud Pública de los EE.UU.: <http://aids.gov/>
- ✓ Proyecto para la combinación de TARGA en Microbicidas: <http://chaarm.eu/>
- ✓ Red de Ensayos de Microbicidas (MTN): <http://www.mtnstopshiv.org/>
- ✓ Red de Ensayos de Vacunas frente al VIH (HVTN): <http://www.hvtn.org/>
- ✓ Sociedad Global de la Vacuna del VIH: <http://www.vaccineenterprise.org/>

ABREVIATURAS

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico

ARN: Ácido RiboNucleico

ARNm: Ácido RiboNucleico mensajero

ARV: AntiRetroViral

ATCC: American Type Culture Collection

AZT: Zidovudina

CADA: Ciclotriazadisulfonamida

CCL19: Chemokine (C-C motif) ligand 19

CCL21: Chemokine (C-C motif) ligand 21

CCR5: C-C chemokine receptor type 5

CD: Célula Dendrítica.

CDi: Célula Dendrítica inmadura.

CDm: Célula Dendrítica madura.

CD14: "Cluster of Differentiation" 14

CD4: "Cluster of Differentiation" 4

CD45-RA: "Cluster of Differentiation" 45-RA

CD8: "Cluster of Differentiation" 8

CD80: "Cluster of Differentiation" 80

CD81: "Cluster of Differentiation" 81

CD83: "Cluster of Differentiation" 83

CD86: "Cluster of Differentiation" 86

CFSE: CarboxiFluoresceinin Succinimidil éster

CI: Combinatorial Index (Índice de Combinación)

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: DiMetilSulfóxido

DS-PPIg4: Glicodendrímtero neutro PPI "Dense-shell" de cuarta generación

DS-PPIg4-3(NH₂): Glicodendrímtero catiónico (+3) PPI "Dense-shell" de cuarta generación

DS-PPIg4-6(NH₂): Glicodendrímtero catiónico (+6) PPI "Dense-shell" de cuarta generación

EC₅₀: Concentración Efectiva 50

EFV: Efavirenz

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ETS: Enfermedad Transmisión Sexual

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FDA: Food and Drug Administration

FITC: Fluoresceína IsoTioCianato

G₂-NH⁺: Fosforodendrímtero catiónico (24+) de segunda generación.

G2-NF16: Dendrímtero aniónico (-16) de tipo carbosilano con grupos naftilsulfonato de segunda generación

G₃-NH⁺: Fosforodendrímtero catiónico (+48) de tercera generación.

G3-S16: Dendrímtero aniónico (-16) de tipo carbosilano con grupos sulfato de tercera generación

GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

Gp120: Glicoproteína superficial 120

Gp41: Glicoproteína 41

GVHD: Graft-Versus-Host-Disease

HEC-1A: Human Endometrial Carcinoma cells

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

IFM: Intensidad de Fluorescencia Media

IFMi: Intensidad de Fluorescencia Media integrada

IFN: Interferón

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-2: Interleuquina 2

IL-4: Interleuquina 4

IL-5: Interleuquina 5

IL-6: Interleuquina 6

IL-7: Interleuquina 7

IL-8: Interleuquina 8

IL-10: Interleuquina 10

IL-12p70: Interleuquina 12p70

IMP: Índice de Movilidad Progresiva espermática

I_H: Intensidad de emisión horizontal de la luz polarizada

I_V: Intensidad de emisión vertical de la luz polarizada

Julio-G₄-NH⁺: Fosforodendrímico catiónico (+80) de cuarta generación marcado fluorescentemente con juloidina.

LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen 1

LPS: LipoPoliSacárido bacteriano

LTR: Long Terminal Repeat

MHC: Major Histocompatibility Complex

MOI: Multiplicity Of Infection

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

MVA : Modified Vaccinia Ankara

MVC: Maraviroc

NCCLS/CLSI: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NIH: *National Institutes of Health*

NNRTI: *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (Inhibidor no nucleósido de la RT)

NRTI: *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (Inhibidor nucleósido de la RT)

OS-PPIg4: Glicodendrímico catiónico (+32) PPI "Open-shell" de cuarta generación

PAMAM: Poli(amido amina)

PBS: Phosphate buffered saline

PC5: Phycoerythrin-Cyanin 5.

PC7: Phycoerythrin-Cyanin 7.

PHA: phytohemagglutinin (Fitohematoaglutinina)

PPI: Polipropilenimina

rEGF: recombinant Epidermal Growth Factor (factor de crecimiento epitelial humano recombinante).

REM: Recuperación de Espermatozoides Móviles

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RT: Retrotranscriptasa

RTI: Reverse Transcriptase Inhibitor (Inhibidor de la transcriptasa inversa).

SFB: Suero Fetal Bovino

SIDA: Síndrome de la InmunoDeficiencia Adquirida

Siglec-1: "Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin 1"

TAE: Tris-acetato-EDTA

TAMRA: Carboxitetrametilrodamina

TARGA: Tratamiento AntiRetroviral de Gran Actividad

TDF: Tenofovir Disoproxil Fumarato

TEER: Transepithelial Electrical Resistance (Resistencia Eléctrica Transepitelial)

TFV: Tenofovir

TNF: *Tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral)

T-20: Enfuvirtida

UV: Ultra Violeta

VHS-2: Virus del Herpes Simplex tipo II

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VOICE: Vaginal and Oral Interventions to Control de Epidemic

VSVG: Vesicular Stomatitis Virus-G protein

AGRADECIMIENTOS

Parece que nunca llegaría la meta de esta carrera...pero ya se ve la línea y estoy a punto de cruzarla. ¡Qué rápido pasa el tiempo! Ufff! Y como empezar...Tantos recuerdos, tanta gente a la que darle las gracias, tanto trabajo detrás de estas páginas...

En primer lugar, muchas gracias a M^a Ángeles por haberse lanzado a la piscina y haber apostado por mí desde el principio sin saber donde se metía, por toda su ayuda, por su comprensión y por enseñarme que con coraje, sacrificio y trabajo se puede llegar lejos. Mil gracias a la “boss”, a Marjorie, por estar siempre ahí, por su apoyo, porque si soy algo, aunque sea poco, en eso que llamamos “ciencia” se lo debo a ella, por enseñarme siempre a ir un poquito “más allá”, soportar mis agobios al principio, pero sobretodo por ser más amiga que jefa. Por todo gracias.

Gracias a toda la gente del labo, los que están y los que partieron, porque siempre estuvieron ahí al pie del cañón. Nunca me faltó quien me echara una mano, me diese un consejo o resolviese una duda. A los Rafas, Irenes, Lola, Isa, Jorge, Almu, Coral, Pepa, José Luis, Luis, Mabela, Verónica, Sandra, Miguel, Santi (alias “Capitán Bayeta”), Susana, Chusa, Maribel, Judith, Didi, Ricardo, Teresa, Silvia, Talía, Regina, Chonco, Alberto, Nati, Carmen...mil gracias, porque parte de esta tesis también os pertenece. Mil gracias también a Marta y Raquel, mis compis en aquel insuperable eventos’team 2012 (¡vivaya ratos de *shopping* por Madrid!), a los quinielistas por esas cañas y discusiones futbolísticas (aunque siempre me tocara pagar, vaya paquete...), a los chic@s del máster, y a los “jóvenes del labo” a los que la noche nos confunde... ¿Habría que repetir esos bailes y esas fiestas del “Orgullo”, no? Gracias por esas risas, no iba a ser todo darle a la pipeta. Gracias a Laura, por estar ahí codo con codo (nunca mejor dicho) y a Pilar, inseparable compi de buceo (¡ay que peripecias! “*globo-woman*”) y a la que no echaremos del labo ni con agua caliente.

Y gracias a mis “Mojinos”, ese trío calavera: Javi, Dani y Hugo, por tantos momentos inolvidables, esas juergas, charlas futboleras y por haberos convertido casi sin darme cuenta en algo más que compañeros del labo. Javi, mil gracias por tu ayuda con la tesis “Mr.Photoshop”. ¡Te debo algo más que unas cañas!

Gracias a todo el personal del animalario del hospital, a Marek Maly, y a la gente de Alcalá, Rafa, Javi, Paula, Sandra, etc, porque sin vosotros esto tampoco habría sido posible. No puedo olvidarme de las chicas y chicos del Clínic de Barcelona: Laia, la Rovira, la Climent, Isaac, Víctor, por haberme hecho sentir como en casa los días que estuve allí (“mastercards” a parte...XD) y de la gente del laboratorio del Prof. Soren Paludan en Aarhus, especialmente de Line, por ser como una madre en aquel frío invierno danés. Winter is coming!

Gracias a mis amigos de Guada, Ocón, Moyita, Hassan, Corralo, M^a Ángeles, Gingru, Chusa, Blas, Maite, Fiera, Megi, Xexu, Vane, Torre, Sara, Rus, Pana, Viti, mi bandada de “gorriones”, que aunque ahora estemos de migración (debe ser por eso del cambio climático), sabemos que siempre volaremos juntos. También gracias a mis niñas de la uni, a Aran (mi hermana “postiza”), mi Isilla y su

“perita”, Ro, Javi, Vir, Glori, Almu y como no a mi pequeña sobri que nos ha inundado a todos de alegría (¡y el whassap de fotos!).

Gracias también a la gente del Máster de Biomedicina: Aris, Sofía, Sandras, Albas... por tantos buenos ratos y esas cañitas en la Latina; a la gente del Máster de Aliter, a mis compis en Genómica, a la gente de Madrid, Carlos, Pilar, María’s friends... Un cachito de la tesis también va por vosotros. Gracias también a Merxe y Loli, esas auténticas “lideresas” con las que además he compartido la aventura de una tesis. Me habéis dejado el último, pero ya casi os pillo.

Mil gracias a mi familia, a mis abuelos, los que están y los que no, porque si soy lo que soy es gracias a ellos. Y a mis padres y a mi hermano. No encuentro muy bien las palabras con las que decirles lo que representan para mi vida. Porque son TODO. Esta tesis es para ellos.

Y finalmente gracias a mi Caperucita, por apoyarme siempre, aguantar mis ronquidos cada noche, hipnotizarme con esa sonrisa, pero sobretodo... por dejarme cambiar el final del cuento.

A todos, GRACIAS. Quique

